

**DIFFERENZIERUNG VERSCHIEDENER GEBUNDENER
UND EINES FREIEN CALMODULIN-POOLS
IN DER SKELETTMUSKELZELLE**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jürgen Kaiser
aus
Mettlach

München
Juni 1988



DIFFERENZIERUNG VERSCHIEDENER GEBUNDENER UND EINES FREIEN

CALMODULIN-POOLS IN DER SKELETTMUSKELZELLE

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Jürgen Kaiser

aus

Mettlach

München

Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Jennissen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

eingereicht am: 22.6.88

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.98



drucken + binden
gmbh

Schellingstraße 23
8000 München 40

☎ 089/284445

Meiner Mutter

Daß schließlich die transzendente Ästhetik nicht mehr, als diese zwei Elemente, nämlich Raum und Zeit, enthalten könne, ist daraus klar, weil alle andre zur Sinnlichkeit gehörige Begriffe, selbst der der Bewegung, welcher beide Stücke vereinigt, etwas Empirisches voraussetzen. Denn diese setzt die Wahrnehmung von etwas Beweglichem voraus. Im Raum, an sich selbst betrachtet, ist aber nichts Bewegliches: Daher das Bewegliche etwas sein muß, was im Raume nur durch Erfahrung gefunden wird, mithin ein empirisches Datum. Eben so kann die transzendente Ästhetik nicht den Begriff der Veränderung unter ihre Data a priori zählen: denn die Zeit selbst verändert sich nicht, sondern etwas, das in der Zeit ist. Also wird dazu die Wahrnehmung von irgend einem Dasein, und der Sukzession seiner Bestimmungen, mithin Erfahrung erfordert.

Immanuel KANT (Kritik der reinen Vernunft, 1787)

Er ist ein Denker: das heißt er versteht sich darauf, die Dinge einfacher zu nehmen, als sie sind.

Friedrich NIETZSCHE (Die fröhliche Wissenschaft, Aphorismus 189, 1886)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Herbert Jennissen am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Zeit von Mai 1983 bis Mai 1988 durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, sein stetes Interesse und seine ständige Bereitschaft mit Rat und Tat zu helfen.

Herrn Prof. Dr. Guido Hartmann danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Für ihre tatkräftige Mithilfe bei den Großpräparationen möchte ich mich bei Frau Gundula Botzet und Herrn Rainer Ziegenhagen bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Hedwig Unterturner und Herrn Joseph Reiter für ihre verantwortungsvolle Betreuung der Tiere.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555213_0031

ABKÜRZUNGEN

4B	Sepharose 4B
app.	apparent
d	Tag
m	Masse
n	Anzahl der Messungen
spez.	spezifisch
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Masse zu Volumen
w/w	Masse zu Masse
Abb.	Abbildung
AG	Aktivierungsgrad
AMP	Adenosinmonophosphat
ANSA	1-Amino-2-hydroxinaphtalin-sulfonsäure
BH-CaM	Nach der BOLTON-HUNTER-Methode iodiertes Calmodulin
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
CPM	Impulse pro Minute
CT-CaM	Nach der Chloramin T-Methode iodiertes Calmodulin
Delta	integrale Calmodulin-Untereinheit der Phosphorylase Kinase
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DPM	Zerfälle pro Minute
DTE	Dithioerythrit
$E_{\lambda \text{ nm}}$	Extinktion bei $\lambda \text{ nm}$
EA	enzymatische Aktivität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
Fr.-Nr.	Fraktionsnummer
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FP	Fluphenazin
GP	Natrium-beta-Glycerophosphat

K ₀	Degradationskonstante
K _M	Michaelis-Konstante
Konz.	Konzentration
Myo-CaM	Calmodulin aus Myofibrillen
ME	beta-Mercaptoethanol
MW	Molekularmasse
Phos b	Glykogenphosphorylase b
PhosKin	Phosphorylase Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PH-	Phenyl-
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Turnoverquotient
Q ₀ ,	spezifische Radioakt. (Tracer) zu spezifischer Radioakt. (Endprodukt)
QF	Quenchfaktor
SA	spezifische Enzymaktivität
Seon	Sepharose
S.F.	Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIE	apparatives Quenchverhältnis (Wertebereich: 0-1000)
SR	spezifische Radioaktivität
T _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFP	Trifluoperazin
TNC	Troponin C
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL und METHODEN	8
2.1 Präparative Methoden	8
2.1.1 Herstellung von Fluphenazin-Sepharose nach ROCLETTE-EGLY et al. (1982)	8
2.1.2 Präparation von Phosphorylase b nach FISCHER & KREBS (1958)	9
2.1.3 Präparation von Phosphorylase Kinase nach COHEN (1973) modifiziert nach JENISSEN & HEILMEYER (1975)	11
2.1.4 Isolierung der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase	13
2.1.5 Isolierung von Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel- Homogenat	14
2.1.6 Isolierung von freiem Calmodulin aus dem Säure-Überstand der Phosphorylase Kinase-Fällung	15
2.1.7 Isolierung von integralem Calmodulin und Troponin C aus Myofibrillen	16
2.1.8 Isolierung von Calmodulin aus Rinderhoden nach AUTRIC et al. (1980)	17
2.2 Darstellung modifizierter Calmoduline	17
2.2.1 Darstellung von ^{125}I -Calmodulin aus Kaninchenskelett- muskel nach der Chloramin T-Methode von HUNTER & GREENWOOD (1962)	17
2.2.2 Darstellung von ^{125}I -Calmodulin aus Kaninchenskelett- muskel nach der Methode von BOLTON & HUNTER (1973)	19
2.2.3 Darstellung von nicht-radioaktivem CT-CaM und BH-CaM	20
2.3 Isotopenverdünnungsexperimente	21
2.3.1 Voraussetzungen zur Berechnung der Poolgrößen	24
2.4 Versuchstiere	25
2.5 In vivo Markierung der untersuchten Proteine mit radioaktiven Aminosäuren	25
2.5.1 Vorbereitung der Injektionen	25
2.5.2 Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin	25

2.5.3	Pulsdoppelmarkierung mit ^3H -Leucin und ^{14}C -Leucin nach ARIAS et al. (1969) & HUBBARD (1978)	26
2.6	Analytische Methoden	27
2.6.1	Proteinbestimmung im automatisierten Test nach LOWRY et al. (1951)	27
2.6.2	Bestimmung der Phosphatkonzentration im automatisierten Test nach FISKE & SUBBAROW (1925)	27
2.6.3	Bestimmung der enzymatischen Glykogen-Phosphorylase Aktivität im Autoanalyser nach HASCHKE & HEILMEYER (1972)	28
2.6.4	Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase im automatischen Test nach JENNISSEN & HEILMEYER (1974)	29
2.6.5	Aktivierung der Phosphorylase Kinase im automatischen Test nach COHEN (1980) und BoHM & JENNISSEN (1985)	30
2.6.6	Bestimmung der Glykogenkonzentration nach MONTGOMERY (1957)	30
2.6.7	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)	31
2.6.7.1	SDS-PAGE nach LAMMLI (1970)	31
2.6.7.2	Calcium-abhängige SDS-PAGE nach WILLIAMS et al. (1984)	34
2.6.7.3	Farben und Entfärben der SDS-Gele	34
2.6.7.4	Dokumentation der SDS-Gele	34
2.6.7.5	Anfertigen von Autoradiogrammen	35
2.6.8	Radioaktivitätsmessung	35
2.6.8.1	Messung der Gammastrahlung von ^{125}I -markierten Proteinen	35
2.6.8.2	Messung der Radioaktivität in $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - doppelmarkierten Proteinen	36
2.6.8.3	Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse der Turnover- Quotientenunterschiede.	43
2.7	Computergraphiken	45
2.8	Elektronische Chromatographie-Überwachung	45

3. ERGEBNISSE	47
3.1 Bestimmung der Poolgröße des Calmodulins	47
3.1.1 Kriterien für die Wahl der Iodierungsmethode	47
3.1.2 Teste zur Verwendbarkeit verschiedener Calmodulin-Derivate	48
3.1.2.1 Untersuchungen zur Nativität verschieden iodierter Calmoduline	49
3.1.2.2 Selektion des Iodcalmodulins	51
3.1.3 Bestimmung der gesamten Calmodulin-Menge im Skelettmuskel	52
3.1.3.1 Isolierung von Calmodulin aus Muskelhomogenat	52
3.1.3.2 Ergebnis der Calmodulin-Poolgrößenbestimmung aus Homogenat	59
3.1.4 In vitro-Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools	60
3.1.4.1 Isolierung von Calmodulin aus Säureüberstand und Myofibrillen	64
3.1.4.2 Differenzierung von drei verschiedenen Calmodulin-Pools und Bestimmung der Poolgrößen	74
3.2 In vivo Turnover-Messungen	77
3.2.1 Problemstellung und Methodenwahl	77
3.2.2 Glykogengehalt des Rohextraktes	79
3.2.3 Isolierung der doppelmarkierten Calmoduline	81
3.2.4 Bestimmung der spezifischen Radioaktivitäten in den doppelmarkierten Proteinen	87
3.2.5 Verlaufskurven der spezifischen ^3H -Radioaktivität	90
3.2.6 Abschätzung der Halbwertszeiten der isolierten Calmoduline	91
3.2.7 Bestimmung der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnover-Quotienten der isolierten doppelmarkierten Calmoduline	95
3.2.8 Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools	99
3.2.8.1 Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse der Turnover-Unterschiede der Calmoduline	102

4. DISKUSSION	104
4.1 Eigenschaften der radioiodierten Calmodulin-Derivate	104
4.2 Calmodulin-Gehalt der Skelettmuskelzelle des Kaninchens	110
4.3 Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools in der Skelettmuskelzelle	112
4.4 Ergänzende Aussagen zur Differenzierung dreier unterschiedlicher Calmodulin-Pools mit Hilfe der in vivo- Turnover-Messungen	120
4.5 Zur Polygenhypothese von Calmodulin	122
4.6 Ausblick	124
5. ZUSAMMENFASSUNG	125
6. LITERATUR	127
7. ANHANG	138
7.1 Elektronische Chromatographie-überwachung	138
7.2 Tabelle zu Abbildung 25	141

EINLEITUNG

Säugetiere bestehen aus einer unübersehbaren Vielzahl von verschiedenen Zellen. Diese tauschen Informationen untereinander aus. In der Regel geschieht diese zelluläre Verständigung durch den Kontakt der Zellen untereinander oder durch chemische oder elektrische Signale.

Zellorganellen und Kompartimente kommunizieren ebenfalls miteinander, gewöhnlich mittels chemischer Signale wie zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Calciumionen (CHEUNG, 1985). Die Art und Weise, wie zelluläre Regulationsmechanismen mit diesen Signalen funktionieren, ist schon lange Gegenstand der biochemischen Forschung, jedoch gelang es erst während der letzten 30 Jahre diese Mechanismen auf einem molekularen Niveau zu verstehen. So wurde zwischen 1957 und 1962 von SUTHERLAND und Mitarbeitern entdeckt, daß cAMP die glykogenolytische Wirkung von Glukagon in der Leber vermittelt (RALL et al., 1957; RALL & SUTHERLAND, 1958; SUTHERLAND et al., 1962).

Die Bedeutung von Ca^{2+} für die zelluläre Regulation wurde lange vor der Entdeckung des cAMP erkannt. So berichtete Sidney RINGER 1883, daß Calciumionen im Nährbad notwendig waren, um die Kontraktilität eines präparierten Froschherzes aufrecht zu erhalten. Erst mehr als 60 Jahre später demonstrierten HEILBRUNN & WIERCINSKI die kontraktile Wirkung von Ca^{2+} nach Injektion in eine Muskelfaser (HEILBRUNN & WIERCINSKI, 1947). Die Funktion des Calciums ist nicht auf den Muskel beschränkt, sondern erstreckt sich auf nahezu alle Bereiche der Zellphysiologie (CHEUNG, 1985).

Erste Hinweise auf den molekularen Wirkungsmechanismus von Calciumionen im Muskel erhielten EBASHI und Mitarbeiter 1969, indem sie zeigten, daß Troponin C (TNC) Ca^{2+} bindet, und daß hierdurch die Kontraktion sowohl von Skelettmuskel- als auch von Herzmuskelgewebe vermittelt wird.

Seit 1967 berichtet CHEUNG von einem hitzestabilen Proteinaktivator der zyklischen Nukleotid Phosphodiesterase aus Gehirn (CHEUNG, 1967;

1969;1970). Etwa zur gleichen Zeit zeigten KAKIUCHI und Mitarbeiter, daß Mischungen von Phosphodiesterase-haltigen Extrakten und diesem 'Phosphodiesterase-Aktivierungsfaktor' selbst in Gegenwart von 3 mM Mg^{2+} , solch niedrige Konzentrationen von lediglich 0,01 mM Ca^{2+} ausreichten, um die Gehirn-Phosphodiesterase ca. 2fach zu aktivieren (KAKIUCHI & YAMAZAKI, 1970a). Noch im selben Jahr gelang es dieser Arbeitsgruppe zu zeigen, daß in Abwesenheit einer hinreichenden Calciumionenkonzentration die Diesterase-Aktivierung nicht funktionierte und daß die minimale Ca^{2+} -Konzentration bei ca. 2 μM lag (KAKIUCHI et al., 1970; KAKIUCHI & YAMAZAKI, 1970b;). KAKIUCHI und Mitarbeiter hielten zu diesem Zeitpunkt die Calciumionen noch für eine Art 'Kofaktor' und konnten seinerzeit auch noch nicht vollständig ausschließen, daß es sich bei der Aktivierung der Phosphodiesterase um eine, unter Umständen proteolytisch bedingte, zeitabhängige Aktivierung handelte (APPLEMAN et al., 1985).

Drei Jahre später wurde der Phosphodiesterase-Aktivierungsfaktor erstmals von WANG und Mitarbeitern aus Herzmuskel homogen erhalten (TED et al., 1973), jedoch findet sich hier noch kein Hinweis für die Rolle der Calciumionen. Noch im selben Jahr gelangten TED und WANG (1973) dann zu dem Schluß: "Der Komplex von Ca^{2+} und dem Proteinaktivator ist der wirkliche Aktivator der cAMP Phosphodiesterase" (zitiert nach: APPLEMAN et al., 1985).

Nachdem der Zusammenhang zwischen Ca^{2+} und einem Akzeptorprotein klar gezeigt war, setzte eine lebhafte Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet ein. So wurde schnell erkannt, daß Adenylat Cyklase durch den Aktivierungsfaktor ebenfalls Calcium-abhängig aktiviert (moduliert) wird (BOSTRUM et al., 1975). Auch die strukturelle Ähnlichkeit zu Troponin C blieb nicht lange verborgen (STEVENS et al., 1976; Watterson et al., 1976). In den folgenden Jahren wurde eine Vielfalt von Funktionen beschrieben, die dieser Aktivierungsfaktor zusammen mit Calciumionen bewirkt (Übersicht: KLEE & VANAMAN, 1982; CHEUNG, 1985; STOCLET et al., 1987). Jedoch herrschte bis 1978 eine Namensvielfalt für diesen Proteinaktivator. Dem bereitete CHEUNG (1978) ein Ende, indem

er für den Aktivierungsfaktor den Namen "CALMODULIN" vorschlug. Dieser Name stellt eine Abkürzung für 'Calcium-Modulator-Protein' dar und vereinigt somit die Haupteigenschaften des Calmodulins (CaM), nämlich die Bindung von Ca^{2+} -Ionen und die sich hieraus ergebende Fähigkeit, Enzymaktivitäten zu modulieren und dadurch verschiedenste enzymatische Aktivitäten in den unterschiedlichsten Zelltypen zu regulieren. Dieses Calmodulin ist ein hitzestabiles, hochkonservatives, saures Protein, dem die sonst typischen Aminosäuren Cystein und Tryptophan fehlen. Es hat eine Molekularmasse von 16700 Da. Es ist ein Polypeptid mit einer Kettenlänge von 148 Aminosäureresten, wobei das N-terminale Ende acetyliert ist und die Position 115 ein Trimethyllysin enthält (WATTERSON et al., 1980). Pro Molekül können vier Calciumionen in den vier, überwiegend saure Reste enthaltenden Bindungsstellen gebunden werden (vergleiche Abb. 1.1).

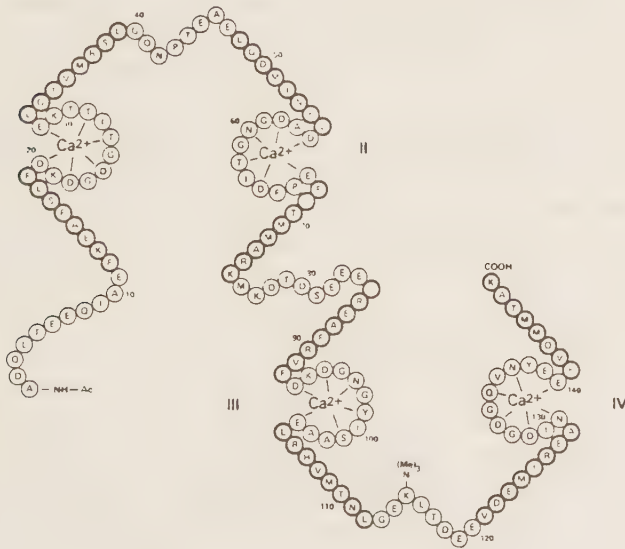


Abb.1.1: Calmodulin-Sequenz nach WATTERSON et al., 1980. (Abbildung aus KLEE & VANAMAN, 1982).

Jede Calcium-Bindungsschleife (römische Ziffern) besteht aus 12 Aminosäureresten. Die Aminosäuren sind folgendermaßen abgekürzt:

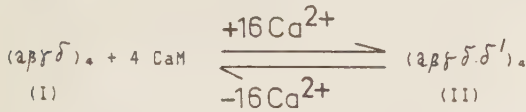
A=Alanin, D=Asparaginsäure, E=Glutaminsäure, F=Phenylalanin, G=Glyzin, H=Histidin, I=Isoleucin, K=Lysin, L=Leucin, M=Methionin, N=Asparagin, P=Prolin, Q=Glutamin, R=Arginin, S=Serin, T=Threonin, V=Valin, Y=Tyrosin.

Der Calcium-abhängige Wirkungsmechanismus von Calmodulin läßt sich dadurch erklären, daß die Calciumionen zuerst die Konformation des Calmodulins ändern und anschließend diejenige des Rezeptorenzyms, wobei eine erhöhte Enzymaktivität die Folge ist. Dieser Zusammenhang kann wie folgt verdeutlicht werden (CHEUNG, 1985):



Der '*' deutet eine neue Konformation an, E ist das Rezeptorenzym. Inzwischen sind viele Rezeptorenzyme des Calmodulins bekannt (Übersicht: KLEE & VANAMAN, 1982; CHEUNG, 1985), so beispielsweise die Myosin-Leichtkettenkinase (YAGI et al., 1978) und die Glykogen Synthase Kinase (PAYNE & SODERLING, 1980) im Muskelgewebe. Eine außergewöhnliche Besonderheit stellt ein Schlüsselenzym der Glykogenstoffwechselregulation dar, nämlich die Phosphorylase Kinase. Dieses Enzym wurde erstmals 1956 (KREBS & FISCHER) aus Kaninchenskelettmuskulatur charakterisiert. Obwohl schon seit 1971 bekannt war, daß die Phosphorylase Kinaseaktivität Calcium-abhängig ist (FISCHER et al., 1971), wurden bei ihrer Reinsolierung (COHEN, 1973) lediglich drei Untereinheiten charakterisiert. Es dauerte weitere fünf Jahre bis entdeckt wurde, daß diese Calcium-abhängige Proteinkinase aus einem Tetramer von vier heterologen Untereinheiten zusammengesetzt ist: Alpha (140 KDa), Beta (120 KDa), Gamma (42 KDa) und Delta (16,7 KDa). Dabei wurde gezeigt, daß die Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase identisch mit Calmodulin ist (COHEN et al., 1978; SHENOLIKAR et al., 1979; GRAND et al., 1981). Bei dieser Proteinkinase handelt es sich also nicht um ein Calcium-abhängig gebundenes Calmodulin im Sinne eines Rezeptorenzyms, sondern um einen integralen, also Calcium-unabhängig, gebundenen Calmodulin-Pool der Skelettmuskelzelle. Die Phosphorylase Kinase kann in vitro zusätzlich noch durch Zugabe von Calciumionen und nicht integralem Calmodulin aktiviert werden (SHENOLIKAR et al., 1979). Das dabei Calcium-abhängig an die Kinase gebun-

dene Calmodulin wird als "Delta'" (δ') bezeichnet (COHEN et al., 1978; SHENOLIKAR et al., 1979). Die biochemischen Zusammenhänge lassen sich folgendermaßen verdeutlichen:



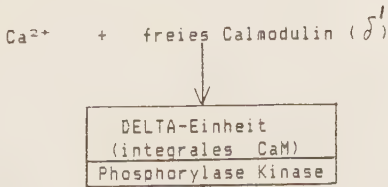
Das Resultat dieser Aktivierungsreaktion (in vitro) ist ein Delta'-Ca²⁺-Kinase-Komplex (II), der etwa 5-10fach aktiver ("überaktiver") ist als der Ca²⁺-Kinase-Komplex (I).

Da ferner die Existenz eines freien Calmodulin-Pools bekannt war (SHENOLIKAR et al., 1979; COHEN, 1980; NAIRN et al., 1984), war es zunächst naheliegend (SHENOLIKAR et al., 1979), daß die Aktivierung der Phosphorylase Kinase in vivo ebenfalls durch diesen freien Calmodulin-Pool erfolgt ("Calmodulin-Hypothese" der Aktivierung der Phosphorylase Kinase). Dieses Aktivierungsschema ist in Abb. 1.2 gezeigt:

Grundaktivitäts:



Calmodulinhypothese:



überaktive Phosphorylase Kinase

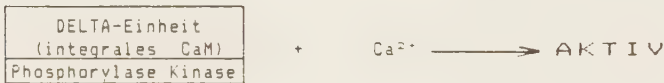
Abb.1.2: "Calmodulin-Hypothese" der Phosphorylase Kinase-Aktivierung in vivo.

Das Calcium-abhängige Einschalten der Grundaktivität geschieht über die integral gebundene CaM-Untereinheit (delta-Untereinheit), der überaktive Zustand wird durch Ca²⁺-abhängig gebundenes delta' (δ') bewirkt.

"überaktiv" bedeutet eine 5-10fache Steigerung der Grundaktivität.

Erste Abschätzungen der Poolgröße (SHENOLIKAR et al., 1979; COHEN, 1980) dieses freien Calmodulins ergaben jedoch Werte, die nicht ausreichten, die Phosphorylase Kinase mit diesem Modulatorprotein aus dem freien Pool zu versorgen. Da diese Calcium-abhängige Proteinkinase in vitro ähnlich wie mit nicht integralem Calmodulin auch mit Holotropenin und Troponin C in Gegenwart von Calciumionen aktiviert werden konnte (COHEN, 1980;1983;1987), wurde daher als Verlegenheitslösung die Hypothese vorgeschlagen (SHENOLIKAR et al., 1979; COHEN, 1980), daß Troponin in vivo das Delta¹ ersetzen könne (vergleiche Abb. 1.3).

Grundaktivität:



Troponinhypothese, COHEN et al.:

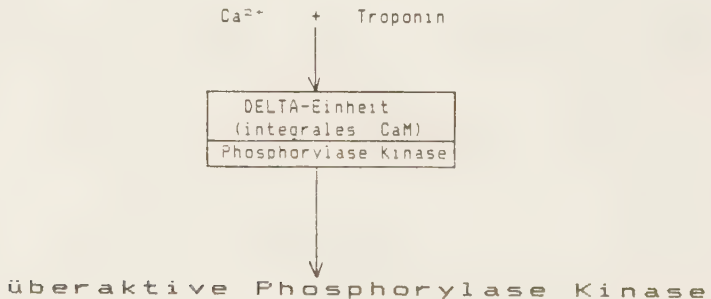


Abb.1.3: "Troponin-Hypothese" der Phosphorylase Kinaseaktivierung in vivo nach COHEN (1980).
Das Calcium-abhängige Einschalten der Grundaktivität geschieht über die integral gebundene CaM-Untereinheit (delta-Untereinheit), der überaktive Zustand wird hier durch Ca^{2+} -abhängig gebundenes Troponin bzw. TNC bewirkt.
"überaktiv" bedeutet eine 5-10fache Steigerung der Grundaktivität.

Dieser "Troponin-Hypothese" von COHEN und Mitarbeitern widersprachen jedoch Immunfluoreszenzuntersuchungen von VEH et al. (1980), die zeigten, daß Phosphorylase Kinase ausschließlich im Sarkoplasma und nicht in den Myofibrillen lokalisiert ist. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Gesamtpoolgröße und deren Verteilung im Kaninchenskelettmuskel untersucht werden. Da sich ferner bei früheren Untersuchungen zum Turnover der vier heterologen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase herausstellte (PETERSEN & JENNISSEN, 1979; PETERSEN, 1981), daß die Calmodulin-Untereinheit (delta-Einheit) die höchste Turnoverrate aller Untereinheiten dieser Kinase besitzt und sich Probleme bei der mathematischen Anpassung des Präkursorpools für die Delta-Untereinheit ergaben, sollten nach ermittelter Verteilung der Gesamtpoolgröße diese Poolbestimmungsexperimente durch in vivo Turnover-Messungen ergänzt werden, um mögliche Unterschiede des freien und des integralen Calmodulin-Pools aufzudecken mit dem Ziel, hierdurch eventuell Hinweise auf eine verschiedene genetische Kontrolle dieser Pools zu erhalten.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Präparative Methoden

2.1.1 Herstellung von Fluphenazin-Sepharose nach ROCLETTE-EGLY et al. (1982)

60-70 g Sepharose 6B (Pharmacia, Freiburg) wurden mit dem dreifachen Volumen Wasser durch Abnutschen über einen Büchner-Trichter vom Merthiolat befreit und anschließend im Wasserstrahlvakuum trocken gesaugt. Dann wurden 50 g trocken genutzte Sepharose in einen 500 ml-Einhalsskolben eingewogen und nacheinander im gut ziehenden Abzug mit (SUNDBERG & PORATH, 1974; EGLY und PORATH, 1979):

25 ml 2 M NaOH

200 mg Natriumborhydrid (p. a., Merck, Darmstadt)

2,5 ml Epichlorhydrin (puriss, Fluka, Neu-Ulm)

versetzt und bei Raumtemperatur kurz gerührt. Anschließend gab man 50 ml NaOH (2 M) und danach 25 ml Epichlorhydrin zu. Diese Mischung wurde 12 h (mit Calciumchlorid-gefülltem Trockenrohr verschlossener Kolben) im Ölbad mit einem Magnetstaubrührer durchmengt. Den Rührer stellte man so ein, daß die Gelkugeln gerade in der Schwebe gehalten wurden. Am folgenden Tag wurde überschussiges Epichlorhydrin mit 5000 ml Wasser aus dem aktivierten Gel im Büchnertrichter ausgewaschen, im Scheidetrichter vom Wasser abgetrennt und durch Verbrennung vernichtet. Das erhaltene Gel wurde wieder trocken genutzt. Dann löste man 5 g Fluphenazin (reinst, SERVA, Heidelberg) in 50 ml Diglycidylether. Das zuvor aktivierte, trocken gesaugte Gel vermischte man mit der Fluphenazin-Lösung. Diese Reaktionsmischung wurde dann 8h unter Lichtausschluß bei 25°C gerührt. Anschließend wurde die erhaltene gelbliche Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose) unter weitestgehendem

Lichtausschluß auf dem Büchnertrichter in folgender Reihenfolge gewaschen:

500 ml 1 M Natriumcarbonat in 1 M NaCl

500 ml Wasser

500 ml 0,1 M Glyzin

500 ml 1 M NaCl

1000 ml Wasser

Das FP-Sepharose-Gel wurde in Wasser mit 0,02% Natriumazid (p.a., Merck, Darmstadt) bei 4°C unter Lichtausschluß verwahrt.

2.1.2 Präparation von Phosphorylase b nach FISCHER & KREBS (1958)

3 kg Kaninchenskelettmuskulatur, die in Packungen zu je 500 g in Polyethylen-Beuteln bei -20° C verwahrt wurden, taute man in warmem Leitungswasser (30-40°C) etwa 30 min auf. In dieser Form wurde das Fleisch durch einen Fleischwolf für den Metzgereibedarf gedreht.

Extraktion:

Die Extraktion des zerkleinerten Muskels erfolgte mit der gleichen Gewichtsmenge bidestillierten Wassers. Der erhaltene Brei wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dieses Muskelhomogenat wurde zur Gewinnung des Rohextraktes, portionsweise in eine vierfache Lage Mullgaze gepackt und abgepreßt. Mit dem Rückstand verfuhr man genauso, nur daß er lediglich 10 min gerührt wurde. Zu einer dritten Extraktion versetzte man den Rückstand mit dem halben Volumen Wasser, rührte 5 min und schleuderte erneut ab. Die vereinigten Extrakte wurden über Glaswolle filtriert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte, wurden, sofern nicht anders angegeben auf Eis, bzw. bei 4°C ausgeführt.

Säurefällung: Der Rohextrakt wird mit 1 M Essigsäure auf pH 5,25 gebracht und 20 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wird über

Glaswolle filtriert und durch Zugabe von festem Kaliumhydrogenkarbonat nahezu neutralisiert (pH 6,8).

Ammoniumsulfatfällung: Der Überstand wurde pro Liter mit 250 g Ammoniumsulfat (41% Sättigung) versetzt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter Ammoniak-Lösung auf pH 7,0 gehalten wird. Nach 90 min Stehen im Kühllabor, wurde 30 min mit 15000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde danach bei Raumtemperatur in 70-100 ml Wasser aufgenommen und 2-3 Stunden gegen 5 l Wasser und anschließend über Nacht gegen 5 l 1 mM Tris/HCl, pH 7,0 dialysiert.

Wärmebehandlung: Die Lösung wurde mit 1/500 ihres Volumens β -Mercaptoethanol (verdünnt in ca 5 ml Wasser) und 1/400 ihres Volumens 200 mM EDTA, pH 7,0 versetzt und mit 2 M Tris auf pH 8,8 eingestellt. Danach inkubierte man die Lösung eine Stunde bei 38°C. Anschließend kühlte man die Lösung auf 4°C ab und stellte mit 1 M Essigsäure einen pH-Wert von 7,0 ein. Den entstandenen Niederschlag zentrifugierte man 15 min mit 30000 g ab.

Kristallisation: Man versetzte den Sedimentationsüberstand mit 1/100 seines Volumens an 1 M Magnesiumacetat und 1/100 seines Volumens an 0,1 M AMP. Die Phosphorylase kristallisiert über Nacht (auf Eis stehend) aus. Am darauf folgenden Tag kristallisiert man das Enzym noch zweimal wie folgt um: Die Kristalle wurden 15 min bei 30000 g sedimentiert, bei Raumtemperatur in 100 ml 20 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,0 gelöst und ein möglicherweise aufgetretener Niederschlag von denaturierten Proteinen abzentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von Magnesiumacetat und AMP, wie zuvor beschrieben, kristallisiert die Phosphorylase wieder aus.

AMP-Abtrennung: Zur Befreiung der Phosphorylase b von ihrem allosterischen Effektor AMP wurde die Kristallsuspension 10 min bei 30000 g zentrifugiert und das Pellet bei 30°C in 10 mM Na- β -Glycerophosphat, 50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0 aufgenommen. Diese Enzymlösung wird über eine Aktivkohlesäule (ca. 1 g Aktivkohle/200 mg Protein, Norit, Serva, Heidelberg) chromatographiert. Die Säule war mit dem letztgenannten Puffer equilibriert und wurde auch damit eluiert. Das Eluat

enthält die AMP-freie Phosphorylase b. Ein Maß für die Reinheit ist der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm. Für die AMP-freie Phosphorylase b beträgt dieser Quotient 0,52 bis 0,54.

2.1.3 Präparation von Phosphorylase Kinase nach COHEN (1973), modifiziert nach JENNISSEN & Heilmeyer (1975)

Die gesamte Präparation erfolgte im Kühllabor bei 4°C bzw. auf Eis.

Schlachten der Tiere: Die männlichen NZW-Kaninchen (Körpergewicht ca. 3kg) wurden durch Injektion von 250 mg Evipan in die marginale Ohrvene getötet und dann durch Eröffnung der A. carotis entblutet. Nach dem Ablösen des Fells wurden die Tiere für 10-15 min auf Eis gelegt. Anschließend entnahm man die gemischte Skelettmuskulatur (etwas mehr als 2 kg). Diese wurde sofort mit zerkleinertem Eis vermischt.

Alle benutzten Puffer enthalten zusätzlich zum Proteolyseschutz noch 5 µg/ml Leupeptinheemisuccinat (Biomol, Ilvesheim), 50 µM PMSF (SERVA, Heidelberg) und 0,02% Natriumazid (p.a., Merck, Darmstadt).

Extraktion: Die Muskulatur wurde durch den Fleischwolf gedreht und je 1 kg zerkleinerter Muskel mit 2,5 l 10 mM Tris, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, pH 8,8 im Edelstahlhomogenisator der Fa. Waring 45s bei mittlerer Stufe homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min in einer präparativen, kühlbaren Großzentrifuge (Jouan, Saint-Nazaire, Frankreich), mit 8000 UPM (11000 g) in einem 6x11-Rotor zentrifugiert. Die Pellets, die im wesentlichen die Myofibrillen enthalten werden bis zur weiteren Verarbeitung (siehe 2.1.7) auf Eis verwahrt. Den erhaltenen Zentrifugationsüberstand filtrierte man über Glaswolle.

Säurefällung: Das Rohextraktfiltrat stellte man mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,9 ein. Kriterium für eine erfolgreiche Fällung der Phosphorylase Kinase war die Unlesbarkeit der Meßskala einer Pipette von der Skalenrückseite.

Diese Suspension wurde bei 8000 UPM (11000 g) im 6x11-Rotor 25 min zentrifugiert. Der Überstand der Säurefällung (Säure-S) wird

weiterverarbeitet wie unter 2.1.6 beschrieben. Die Pellets der Säurefällung wurden mit dem gleichen Volumen 100 mM Na- β -Glycerophosphat, 4 mM EDTA pH 8,0 neutralisiert und anschließend in einem Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) in maximal 360 ml 50 mM Na- β -Glycerophosphat, 20 mM ME, 2 mM EDTA, pH 7,0 (Puffer (1)) homogenisiert.

Ultrazentrifugation: Das Potterhomogenat wird 100 min in der Ultrazentrifuge UZ L8-70, im Rotor 45 Ti (Beckmann, München) mit 30000 UPM (110000 g) zentrifugiert. Den Überstand (30-S) filtrierte man über Glaswolle, das Sediment (30-F) wurde verworfen.

Ammoniumsulfatfällung: Das Filtrat versetzte man mit dem 0,52fachen seines Volumens mit 3,5 M Ammoniumsulfat, pH 7,0. Nach 20 min Stehen auf Eis, sedimentierte man 20 min im 6x250ml-Rotor mit 16000 UPM (12000 g). Das Sediment wurde in 30-40 ml Puffer (1) aufgenommen. Zur Entfernung von Ammoniumsulfat dialysierte man eine Stunde gegen 1 l Puffer (1). Anschließend klarte man die Lösung 10 min mit 27000 g.

Gelfiltration: Der Überstand (50-60 ml) wurde auf eine Sepharose 4B-Säule (Pharmacia, Freiburg), die mit Puffer (1) equilibriert war, aufgetragen. Die Säulennäße betrugen: Durchmesser: 10 cm, Gelbetthöhe: 32 cm, Säulenvolumen: 2,5 l. über Nacht wurde mit ca. 3 l Puffer (1) eluiert (Flußrate 465 ml/h, Fraktionsvolumen 14,5 ml). Von den erhaltenen Fraktionen wurde jede dritte auf ihre Phosphorvlase kinase-Aktivität untersucht, sowie die Proteinkonzentration bestimmt. Diejenigen Fraktionen, die die Enzymaktivität enthalten wurden zusammengefaßt (4B-Pool).

Ionenaustauschchromatographie: Die bei der Gelfiltration zusammengefaßten Fraktionen (500-600 ml) wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Säule war zuvor ebenfalls mit Puffer (1) equilibriert worden. Die Flußrate betrug 100 ml/h, das Fraktionsvolumen 14 ml (Säulennäße: 5 x 18 cm). Nach dem Waschen mit Puffer (1) wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0 bis 1 M angelegt. Bei etwa 0,2 M NaCl zeigten sich drei Proteingipfel. Von diesem Fraktionenbereich wurden SDS-Gradientgele (8-20%, siehe 2.5.6.2) angefer-

tigt. Alle Fraktionen, die nur die vier Untereinheiten der Phosphorylase Kinase enthielten, wurden vereinigt (DI-Pool).

Ankonzentrierung: Der DEAE-Pool wurde wie oben mit Ammoniumsulfat versetzt, zentrifugiert und löste das Pellet in: 50 mM Na- β -Glycerophosphat, 2mM EDTA, 20 mM DTE, pH 7,0 und verwahrte das Konzentrat tiefgefroren.

2.1.4 Isolierung der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase

30-60 mg Phosphorylase Kinase (4-5 mg/ml) wurde zunächst in ihrem Aufbewahrungspuffer: 50 mM Na- β -Glycerophosphat, 2 mM EDTA, 20 mM DTE, pH 7,0 nach COHEN et al. (1978) 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Dabei stieg die Temperatur in den Proben auf etwa 90°C. Danach kühlte man für 15 min im Eisbad ab und sedimentierte das Koagulat 2 min in einer Tischzentrifuge der Firma Eppendorf (11000 g). Die Pellets wurden dann je mit etwa 0,5 ml 20 mM Na- β -Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ M PMSF, pH 7,0 (Puffer (2)) aufgeschlemmt, ca. 30 s vortexiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände vereinigte man, klärte 15 min mit 4000 UPM (6000 g) bei Raumtemperatur und stellte den Klärüberstand auf 3 mM Ca^{2+} ein, sodaß eine freie Calciumionenkonzentration von ca 1 mM resultierte.

Ca^{2+} -abhängige Affinitätschromatographie: Diese Proteinlösung (1-3 mg Proteingehalt, 0,1-0,3 mg/ml) pumpte man bei Raumtemperatur auf eine Fluphenazin-Sepharose-Mikrosäule (Querschnitt: 0,4 cm, Höhe 1-4cm (Insulinspritze mit durchbohrten Spritzenstempeln als Adaptoren), Flußrate: 14 ml/h, Säulenvolumen: 250-500 μ l).

Danach wusch man die Säule zunächst mit 10 Säulenvolumina (SV) Puffer (2), dann mit 10 SV Puffer (2) der zusätzlich noch 300 mM NaCl enthielt. Eluiert wurde mit 20 SV: 20mM Na- β -Glycerophosphat (GP), 300 mM NaCl, 10 mM EGTA, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ M PMSF, pH 7,0. Das Eluat wurde mit fester TCA auf 5% eingestellt, 10 min auf Eis inkubiert und dann mit 4000 UPM (6000 g) zentrifugiert. Das Pellet nahm

man in 10 mM GP, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,0 (CaM-Puffer) auf. Zum Auflösen der Delta-Untereinheit mußte man einige Tropfen 1 N NaOH zusetzen. Diese Lösung (1-2 ml) dialysierte man über Nacht, bei 4°C, gegen 2l CaM-Puffer.

Nach dieser Chromatographie lag das integrale CaM (Delta-Untereinheit) der Phosphorylase Kinase ohne einen weiteren Reinigungsschritt in elektrophoretisch homogener Form vor. Die Ausbeuten betrugen, auf den theoretischen Inhalt des Delta in der Phosphorylase Kinase bezogen ca 50%.

2.1.5 Isolierung von Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel-Homogenat

Ca. 1,5 l des Homogenatbreis aus Abschnitt 2.1.3 wurde zur besseren Gießfähigkeit mit 2,5 l 10 mM Tris, 4 mM EDTA, 4mM EGTA 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 5 μM PMSF, pH 8,8 verdünnt, mit einem Propellerrührer aus V2A-Stahl innig gemischt und dann bei 96°C 5 min erhitzt und sofort auf zerkleinertem Eis abgekühlt. Anschließend sedimentierte man das Koagulat in der präparativen Zentrifuge 30 min 8000 UPM (11000 g), 6x11-Rotor bei 4°C ab. Der Kochüberstand wurde auf 10 mM Ca^{2+} eingestellt, sodaß eine freie Calciumionenkonzentration von ca 2 mM resultierte. Dann neutralisierte man diese Lösung mit 5 N NaOH.

Ca^{2+} -abhängige Affinitätschromatographie: Den Calcium-haltigen Kochüberstand versetzte man mit 100 ml bei 1 g sedimentierter FP-Sepharose (2.1.1) und rührte 45 min bei 4°C unter Lichtausschluß. Anschließend wurde bei Raumtemperatur auf einem Buchnertrichter abgenutscht und das FP-Sepharose-Gel solange mit 20 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl_2 , 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 5 μM PMSF, 0,02% Natriumazid, pH 7,0 (Puffer A), gewaschen, bis der Durchlauf farblos erschien. Die FP-Sepharose gab man in eine Säule mit 5 cm Querschnitt und desorbierte unspezifisch gebundene Proteine durch Spülen mit zehn Säulenvolumina Puffer A, der zusätzlich noch 300 mM NaCl enthielt (Puffer B); (Fluß: 85 ml/h Fraktionsvolumen 7,5 ml). Das adsorbierte Calmodulin eluierte man Ca^{2+} -frei mit 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM EGTA, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 5 μM PMSF, 0,02%

Natriumazid, pH 7,0 (Puffer C).

Von den Fraktionen des Elutionsgipfels im Affinitätschromatogramm wurden SDS-Polyacrylamidgele (15% nach LÄMMLI, 1970 und WILLIAMS et al., 1984) angefertigt. Nach den Elektrophoreseergebnissen wurden die zusammenzufassenden Fraktionen, die nur Calmodulin enthielten, festgelegt. Der Pool wurde mit fester TCA auf 5% Endkonzentration eingestellt, 30 min auf Eis gestellt und dann in der präparativen Zentrifuge 20 min, 16000 UPM (30000 g) im 6x250 ml-Rotor bei 4°C sedimentiert. Die TCA-Pellets neutralisierte man mit 5 N NaOH, nahm in 1 mM Magnesiumacetat, 0,02 mM Calciumchlorid, 20 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µM PMSF, pH 6,5 (Puffer D) auf und dialysierte über Nacht bei 4°C gegen 5l des gleichen Puffers.

Ionenaustauschchromatographie: Das Dialysat pumpte man auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Querschnitt: 2,5 cm, Höhe: 8 cm, Flußrate 100 ml/h). Anschließend legte man einen linearen Gradienten von 100-500 mM NaCl an. Als Equilibrier- und Waschpuffer diente Puffer D, als Gradientbildner diente der anstelle 100 mM NaCl jetzt 500 mM NaCl enthaltende Puffer D (Puffer E). Die Bestimmung und Zusammenfassung der Calmodulinhaltigen DEAE-Cellulose-Fraktionen erfolgte prinzipiell wie unter dem Abschnitt der Affinitätschromatographie an FP-Sepharose beschrieben, jedoch ergaben sich mehrere Peaks der Proteinkonzentrationen als Funktion der Fraktionsnummer, wobei der letzte Peak TNC enthielt (näheres siehe 3.1.3.2). Die vereinigten Calmodulin- bzw. TNC-Fraktionen wurden, wie zuvor beschrieben, TCA-gefällt, zentrifugiert, neutralisiert, in CaM-Puffer aufgenommen und bei 4°C über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert und dann tiefgefroren verwahrt.

2.1.6 Isolierung von freiem Calmodulin aus dem Säure-überstand der Phosphorylase Kinase-Fällung

Der Überstand der Essigsäurefällung der Phosphorylase Kinase aus Kapitel 2.1.3 wird mit 5 N NaOH neutralisiert und mit 1 M CaCl₂-

Lösung auf 10 mM Endkonzentration Ca^{2+} eingestellt. Da der Extraktionspuffer für die Kinase insgesamt 8 mM an Chelatoren war, resultierte eine freie Calciumionenkonzentration von ca. 2 mM. Dann gab man ca. 30 ml bei 1 g sedimentierte FP-Sepharose zu, verdunkelte und rührte, wie unter 2.1.5 beschrieben unter Lichtausschluß 45 min. Dann wurde nach 2.1.5 weiter verfahren. Einziger Unterschied in der Weiterverarbeitung des freien Calmodulins war, daß nach der Dialyse der TCA-gefällten vereinigten EGTA-Fraktionen, gegen Puffer D, gelegentlich vor dem Auftrag auf die DEAE-Cellulose-Säule von denaturiertem Protein abzentrifugiert (10 min, 16000 UPM, (30000 g) 6x250ml-Rotor, 4°C) werden mußte. Dieses Pellet enthielt jedoch nie Calmodulin.

Das isolierte freie Calmodulin wurde ebenfalls tiefgefroren aufbewahrt.

2.1.7 Isolierung von integralem Calmodulin und Troponin C aus Myofibrillen

Die kurzzeitig auf Eis verwahrten Myofibrillenpellets, die bei der Präparation der Phosphorylase Kinase anfallen (Kapitel 2.1.3), wurden je 1 kg mit 2l, 10 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µM PMSF, pH 7,5 im Edelstahlmixer 60 s bei höchster Drenzahl homogenisiert. Wenn das Homogenat zu dickflüssig war, so verdünnte man mit dem selben Puffer nach. Die Myofibrillensuspension wurde, wie unter 2.1.5 beschrieben gekocht, zentrifugiert und der erhaltene Kochüberstand neutralisiert und solange in der Kühltruhe bei -20°C gelagert, bis die Präparation der Phosphorylase Kinase und die Isolierung des freien Calmodulins abgeschlossen (ca. 2-3 Wochen) waren. Dann wurde der Myofibrillen-Kochüberstand unter fließendem warmen Leitungswasser von ca. 45°C innerhalb von 60 min unter häufigem Schwenken der Behälter, zur Vermeidung lokaler Übererwärmungen, aufgetaut. Dann wurde der Kochüberstand im Batch-Verfahren an FP-Sepharose adsorbiert

und weiterverarbeitet wie unter 2.1.6 beschrieben. Bei der Ionenaustauschchromatographie konnte TNC mitgereinigt werden (siehe Kapitel 3.2.4). Beide Ca^{2+} -bindenden Proteine wurden in CaM-Puffer tiefgefroren aufbewahrt.

2.1.8 Isolierung von Calmodulin aus Rinderhoden nach AUTRIC et al. (1980)

1 kg zerkleinerte Rinderhoden (frisch, bei -20°C verwahrt und aufgetaut oder als Acetonpulver) wurde mit 1 l 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 versetzt und 60 s im Edelstahlhomogenisator, bei höchster Drehzahl homogenisiert. Das Homogenat wurde, wie in 2.1.5 beschrieben gekocht und zentrifugiert. Der Kochüberstand wurde dann TCA-gefällt (siehe 2.1.5). Die Pellets nahm man in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 auf und homogenisierte 45 s im Glashomogenisator (Waring) bei höchster Drehzahl. Das Homogenat stellte man auf pH 7,0 ein und dialysierte gegen 10 Volumina 20 mM Tris/HCl, 1 mM CaCl_2 , pH 7,0. Danach wurde wie in 2.1.5 beschrieben verfahren. Das so präparierte CaM wurde z.B. als Standard für die Gelektrophoresen verwendet.

2.2 Darstellung modifizierter Calmoduline

2.2.1 Darstellung von ^{125}I -Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel nach der Chloramin T-Methode von HUNTER und GREENWOOD (1962)

Die Markierung von Calmodulin erfolgt nach der grundsätzlichen Idee von HUNTER & GREENWOOD mit der Ausnahme, daß der harte Gamma-Strahler ^{131}I gegen den weichen ^{125}I ausgetauscht wurde (van ELDIK & WATTERSON, 1981).

Alle verwendeten Substanzen, einschließlich des Calmodulins wurden in

150 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, pH 7,5 gelöst und wie folgt zur Markierungsreaktion in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aus Polyethylen eingesetzt:

Zunächst legte man:

0,010 ml Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel (1mg/ml)

0,010 ml Na^{125}I (37 MBq (1 mCi), 481-629 MBq/ μg Iod, in NaOH-

Lösung, pH 7-11, Amersham-Buchler, Braunschweig)

vor. Dann startete man die Reaktion durch Zugabe von:

0,005 ml Chloramin T (0,8 mg/ml) und durchmischte den Reaktionsansatz innig mit einer 0,1 ml Pipette. Dieser Ansatz wurde 25 Sekunden bei Raumtemperatur (23-25°C) inkubiert und dann durch Hinzupipettieren von 0,005 ml Natriummetabisulfit (1 mg/ml, p.a., Roth, Karlsruhe) und sofortigem Durchmischen gestoppt. Um das erhaltene iodierte Calmodulin vor Radiolyse zu schützen wurden 0,25 ml BSA (25 mg/ml, SERVA, Heidelberg) zugesetzt.

Der vollständige Ansatz wurde zwecks Abtrennung vom unumgesetzten radioaktiven Iod über eine, mit 150 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, pH 7,5 equilibrierte Sephadex G-10-Säule (10 cm Höhe, 1 cm Querschnitt) gelfiltriert. Die Gelfiltration wurde im Freilauf durchgeführt, dabei wurden 0,5 ml-Fraktionen manuell (unter Strahlenschutzbedingungen) gesammelt. Ein Aliquot von 5-10 μl , einer jeden Fraktion, wurde abgenommen und darin die TCA-fällbare Radioaktivität gemessen und gegen die Fraktionszahl aufgetragen (Abb.2). Diejenigen Fraktionen, die die meiste Radioaktivität enthielten wurden zusammengefaßt und in 0,1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren, weil eine Lagerung von mehreren Wochen bei -20°C zu Calmodulinfragmenten führte. Iodcalmodulin, welches aus diesem Pool stammt, wird im Folgenden als CT-CaM bezeichnet.

Typischerweise betrug die Proteineinbaurate zwischen 28 und 45%. Die TCA-fällbare Schrittausbeute für die Gelfiltration lag bei 89-95% und die Gesamtausbeute auf die eingesetzte Radioaktivitätsmenge bezogen

lag zwischen 32 und 43%.

Zur Prüfung auf eventuelle Fragmentierungen des CT-CaM wurde jede iodiierte Calmodulin-Charge durch Autoradiographie einer SDS-Gelelektrophorese kontrolliert.

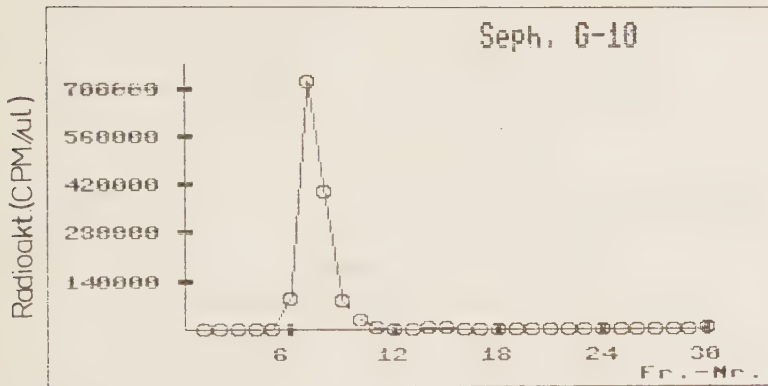


Abb. 2: Gelfiltration von Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel-Calmodulin, welches mit der Chloramin T-Methode ^{125}I -markiert wurde.

Als Säulenmaterial diente Sephadex G-10 (h=10 cm, D=1cm, Freilauf, Fraktionsvolumen: 0,5 ml, Puffer: 150 mM Phosphat, pH 7,5). Die angegebene Radioaktivität gibt die TCA-fällbare Radioaktivität wieder.

Pfeil 1: Poolanfang

Pfeil 2: Poolende

2.2.2 Darstellung von ^{125}I -Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel nach der Methode von BOLTON & HUNTER (1973)

Die Iodierung von Calmodulin mit dieser Methode (BOLTON & HUNTER, 1973) wurde von CHAFOULEAS, et al. 1979) übernommen.

Zunächst wurden 37 MBq (1 mCi) ^{125}I -N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)-propionat (Bolton-Hunter-Reagenz, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig), im gut ziehenden Abzug der Isotopenabteilung, durch einen

über Calciumchlorid getrockneten Stickstoffstrom vom Lösungsmittel (Benzol) befreit. Dabei stellte das Einlaßsystem eine Injektionskanüle dar. Diese wurde mit der Gasleitung gasdicht verbunden und wurde durch den Polyethylendeckel des Reaktionsgefäßes gesteckt. Das Auslaßsystem bestand ebenfalls aus einer Injektionskanüle, auf die der mitgelieferte Aktivkohlefilter aufgesetzt wurde. Diese Maßnahme ist unerläßlich, da sonst beträchtliche Radioaktivitätsmengen in die Filter der Abzugsanlage gelangen würden. Die Trocknung dauerte 32 min.

Zu dem getrockneten Bolton-Hunter-Reagenz gab man 5 µg Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel, welches in 0,01 ml 125 mM Natriumborat-Puffer, pH 8,4 gelöst war. Zur Umsetzung mit den Lysinresten des CaM wurde die Reaktionsmischung 30 min bei 4°C inkubiert. Danach gab man zur Inaktivierung von überschüssigem Bolton-Hunter-Reagenz 0,15 ml 200 mM Glyzin in 125 mM Na-Borat-Puffer, pH 8,4 hinzu und inkubierte 15 min bei 4°C. Dieser Markierungsansatz wurde über eine Sephadex G-25-Säule (coarse, Pharmacia, Freiburg) mit einem Fluß von 10 ml/h, bei einem Fraktionsvolumen von 0,5 ml, chromatographiert. Die Säule bestand aus einer glasernen Einmalpipette mit einem Volumen von ca 10 ml (0,8 x 20 cm). Sie wurde zuvor mit 50 mM Na-Dihydrogenphosphat, 0,05% Na-Azid, 0,25% (w/v) Gelatine (Sigma, München), 100 mM NaCl, pH 7,5 equilibriert.

Die Proteineinbaurate betrug 66%, die Gesamtausbeute auf die eingesetzte Radioaktivität bezogen war 14%, die erreichte spezifische Radioaktivität des Calmodulins betrug ca. $3,8 \times 10^{10}$ CPM/mg.

Von dem erhaltenen markierten CaM wurde ebenfalls ein Autoradiogramm hergestellt. Das nach diesem Iodierungsverfahren markierte Calmodulin konnte ohne Zersetzung über mehrere Wochen bei -20°C verwahrt werden. Dieses Iodcalmodulin wird im Folgenden als BH-CaM bezeichnet.

2.2.3 Darstellung von nicht-radioaktivem CT-CaM und BH-CaM

Zur Überprüfung der biologischen Funktion der hergestellten radio-

iodierten Calmoduline wurden aus naheliegenden Gründen für die entsprechenden, unter 2.1.2 und 2.1.3 beschriebenen Markierungsreagenzien, die nicht radioaktiven Isotope (CT-CaM) oder das gar nicht iodierte Bolton-Hunter-Reagenz (BH-CaM) eingesetzt und dieselben Bedingungen eingehalten, die in den oben erwähnten Kapiteln angegeben wurden.

2.3 Isotopenverdünnungsexperimente

Zur Poolgrößenbestimmung des gesamten und der einzelnen Calmoduline wurde die Technik der Isotopenverdünnung eingesetzt.

Hierzu wurde nach der Chloramin T-Methode (Kapitel 2.2.1) iodiertes (freies) Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel verwendet. Eine ausführliche Begründung, warum dieses CT-CaM verwendet wurde, findet sich in den Abschnitten 3.1.2.1 und 3.1.2.2.

Herstellung eines CT-CaM mit definierter, auf Calmodulin bezogenen, spezifischen Radioaktivität: Bei der Iodierung mit Chloramin T wurden lediglich 10 µg Calmodulin vorgelegt, und man erhielt daher im Iodierungsprodukt ungefähre spezifische Radioaktivitäten von über 6×10^{10} CPM/mg. Für das CT-CaM können nur ungefähre Angaben hinsichtlich der auf Calmodulin bezogenen spezifischen Radioaktivität gemacht werden, da einerseits Calmodulin in Mengen, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der quantitativen Bestimmungsverfahren liegen, im Produkt enthalten sind, andererseits wurde BSA zugesetzt, sodaß eine Proteinbestimmung lediglich eine auf Gesamtprotein bezogene und daher, für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, nutzlose Aussage ergäbe. Deshalb wurde zu einer bestimmten Radioaktivitätsmenge 0,1 mg einunddesselben, reinen Calmodulins, welches man für die Iodierung verwendete, zugegeben. Aus anderen Untersuchungen kann die Ausbeute für die sich an die Iodierung anschließende Gelfiltration mit etwa 50% abgeschätzt werden. Damit ergibt sich bei, zur Iodierung eingesetzten 0,01 mg CaM und zugesetzten 0,1 mg CaM ein rechnerischer Fehler von 5% für die spezifische

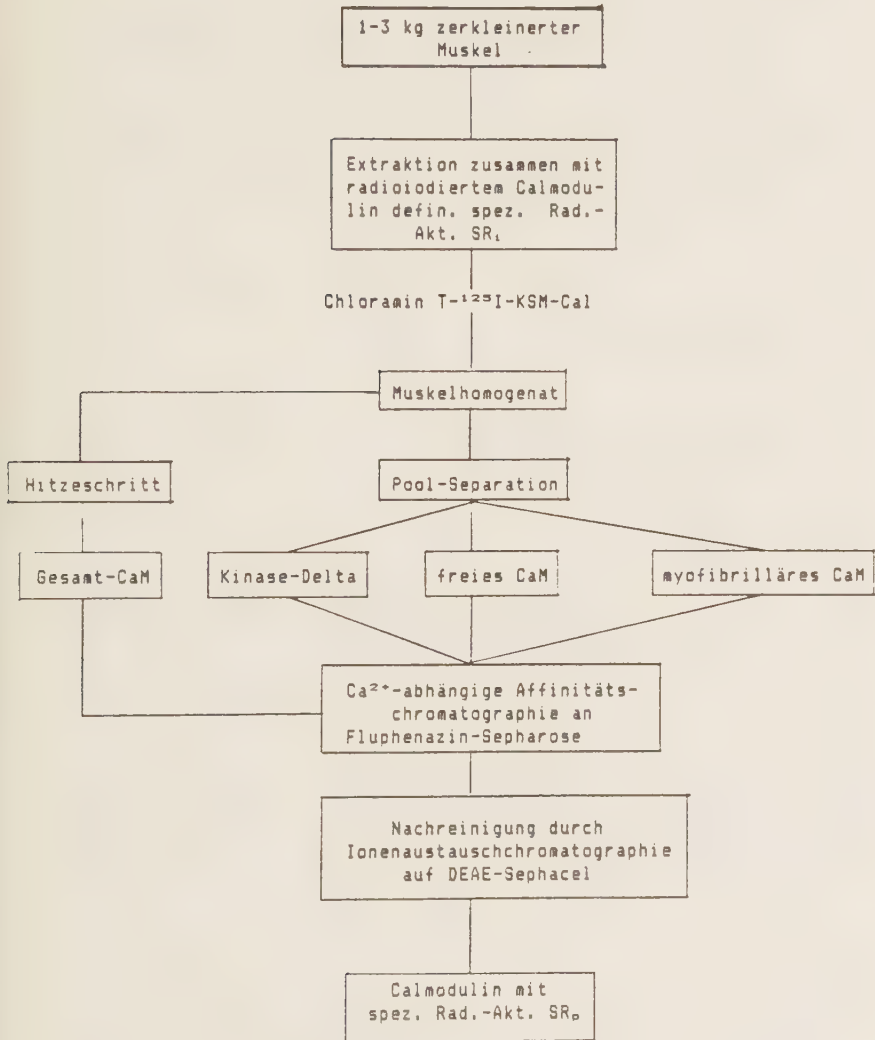
Radioaktivität des Calmodulin/CT-CaM-Gemisches (spezifische Radioaktivität: 5×10^7 bis $1,4 \times 10^8$ CPM/mg). Dieses Gemisch wurde in der Regel einen Tag vor der Präparation hergestellt und bis zur Verwendung ebenfalls in flüssigem Stickstoff verwahrt.

Herstellen des radioaktiven Extraktionspuffers: Für eine Poolbestimmung aus 2-3 kg Kaninchenskelettmuskel wurden zur Calcium-freien Extraktion des Muskelgewebes 5 bis 7,5 l 10 mM Tris, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µM PMSF, 0,02% Natriumazid, pH 8,8 in ein 10l-fassendes Gefäß gegeben und das oben beschriebene, unmittelbar vor Experimentbeginn aufgetaute, CT-CaM/CaM-Gemisch hinzupipettiert. Der radioaktive Extraktionspuffer wurde mit einem Propellerrührer aus V2A-Stahl zwei Minuten, bei mittlerer Drehzahl, innig vermischt.

Danach homogenisierte man, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben. Das erhaltene Homogenat gab man ebenfalls in ein 10l-Gefäß und rührte mit dem Propellerrührer für 30 min, bei niedriger Drehzahl, um eine vollständige Equilibrierung des radiodierten Calmodulins zu gewährleisten. Daran schließen sich die einzelnen Präparationen, wie in den entsprechenden Abschnitten ausgeführt, an. An Hand des Verhältnisses (Q_P , für P kann stehen: H=Homogenat, M=Myofibrillen, S=Saureuberstand) der spezifischen Radioaktivität des als Tracer zugesetzten CT-CaM und derjenigen spezifischen Radioaktivität des Calmodulins eines bestimmten Präparationszweiges wird dann der Gesamtgehalt (Poolgröße) des entsprechenden Calmodulins als Produkt des Verhältnisses Q_P und der eingesetzten Menge CT-CaM in mg/Kg Muskel errechnet.

Die nebenstehende Darstellung (Abb. 3) gibt einen schematischen Überblick über das Konzept der Isotopenverdünnungsexperimente.

Konzept des Isotopenverdünnungs-
experimentes



$$Q = SR_i / SR_p$$

$$P \text{ (mg/kg Muskel)} = Q_p * M_{cal} * \text{(mg/kg Muskel)} \quad (1)$$

Abb. 3: Konzept des Isotopenverdünnungsexperimentes.

SR₁: spezifische Radioaktivität des zugesetzten Iodcalmodulins.

SR_P: spezifische Radioaktivität des Calmodulin-Endproduktes eines bestimmten Präparationszweiges (für P können stehen: H=Homogenat, M=Myofibrillen, S=Säure-überstand)

m_{CaM}*: Menge des zugesetzten CT-CaM pro kg Muskel
Chloramin T-¹²⁵I-KSM-Cal: Nach der Chloramin T-Methode hergestelltes radioiodiertes Kaninchenskelettmuskel-Calmodulin (= CT-CaM)

Kinase-Delta: integrale Calmodulin-Untereinheit der Phosphorylase Kinase

2.3.1 Voraussetzungen zur Berechnung der Poolgrößen

Die in Abb.3 angegebene Gleichung (1) kann nur unter folgenden Bedingungen angewendet werden:

- a) Bei vollständigem Austausch des Tracers mit EGTA-extrahierbarem, nicht integral gebundenen Calmodulin.
- b) Bei freigesetztem (z.B. durch Erhitzen) integral gebundenem Calmodulin, welches dann zum Austausch gezwungen wird, insbesondere dadurch, daß nach dem Kochschritt eine vollständige Equilibrierung des Tracers mit dem freigesetzten Calmodulin durch Rühren gewährleistet war.

Gleichung (1) wurde nicht angewendet im Falle der Phosphorylase Kinase, da diese als Ganzes isoliert wurde und die integrale Delta-Untereinheit nicht freigesetzt wurde.

2.4 Versuchstiere

Die Kaninchen für alle in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Untersuchungen waren männliche Tiere des Inzuchtstammes "Weiße Neuseeländer" (NZW-Kaninchen), mit einem Körpergewicht von ca. 3 kg. Sie wurden immer vom selben Lieferanten bezogen (Institut für wissenschaftliche Versuchstierzucht GmbH, Geretsried-Gelting,). Sämtliche Tiere wurden 14 Tage vor Versuchsbeginn an die Konstantbedingungen (23-25°C, künstlicher 12h Tag mit Neonwarmtonröhren, Wasser ad lib., Ernährung im Erhaltungsbedarf (näheres in 3.2.1) mit Kanin 4 (Matador, Recklinghausen-Süd)) im Stallraum der Isotopenabteilung adaptiert. Tiere, die irgendwelche Krankheitserscheinungen zeigten wurden ausgesondert und nicht in den Versuchen verwendet.

2.5 In vivo Markierung der untersuchten Proteine mit radioaktiven Aminosäuren

2.5.1 Vorbereitung der Injektionen

Den NZW-Kaninchen (4 Tiere) wurde zur Sicherung eines venösen Zugangs in einer marginalen Ohrvene ein Venenkatheter aus Teflon gelegt (Abbocath-T 22G, Länge: 32 mm, Außendurchmesser: 0,9 mm, Luer-Konus, Fa. Deutsche Abbott, Wiesbaden). Auf den Katheter setzte man einen zuvor mit steriler isotoner Kochsalzlösung (Braun Melsungen, Melsungen) gefüllten Drei-Wege-Hahn (Luer-Konus, Hersteller: Sorenson Research Co., Salt Lake City, USA; Lieferant: Braun Melsungen).

2.5.2 Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin

Zur Pulsmarkierung mit ^3H -Leucin injizierte man den Tieren über den

Venenkatheter ein Lösung von L-(4,5- ^3H)Leucin in 2% Ethanol (spezifische Radioaktivität: 2,33 TBq/mmol, Amersham-Buchler, Braunschweig). Die intravenös verabreichte Dosis betrug pro kg Körpergewicht 13,3 MBq (360 μCi). Um zu gewährleisten, daß der radioaktive Inhalt der Spritze quantitativ in die Versuchstiere gelangte, wurde diese über den Drei-Wege-Hahn mit physiologischer NaCl-Lösung gespült und die Spüllösung den Tieren ebenfalls injiziert. Danach wurde auch der Venenkatheter mit NaCl-Lösung gespült und danach entfernt. Dabei achtete man streng auf eine feste Kompression der Einstichstelle, damit es nicht zu Blutungen kam und dadurch Radioaktivität verloren ging. Nach 2 Tagen ^3H -Leucin-Inkorporationsdauer wurden die Tiere geschlachtet, die weiße Muskulatur entnommen und die Proteine, wie beschrieben isoliert.

2.5.3 Pulsdoppelmarkierung mit ^3H -Leucin und ^{14}C -Leucin nach ARIAS et al., 1969 & HUBBARD, 1978

Zur Pulsdoppelmarkierung wurde zunächst eine Pulseinfachmarkierung mit ^3H -Leucin durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.2) und nach ^3H -Inkorporationszeiten von 5 bis 20 Tagen, eine zweite Pulsmarkierung mit L-(U- ^{14}C)-Leucin in 2% Ethanol (spezifische Radioaktivität: 12,7 GBq/mmol, Amersham-Buchler, Braunschweig) angeschlossen wurde. Die verabreichte ^{14}C -Leucin-Menge betrug pro kg Körpergewicht 2,6 MBq (70 $\mu\text{Ci/kg}$). Es wurde ebenso nachgespült wie bei der Einfachmarkierung. 24 Stunden nach der Applikation des zweiten Leucin-Pulses wurden die Tiere geschlachtet und die doppelmarkierten Proteine aus dem weißen Muskel präpariert. Die gesamte ^3H -Leucin-Inkorporationsdauer verlängerte sich damit um einen Tag, sodaß sich Einwirkzeiten von 6-21 Tagen für ^3H -Leucin und für ^{14}C konstante Markierungszeiten von 24 h bei der Pulsdoppelmarkierung ergaben.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Proteinbestimmung im automatisierten Test nach LOWRY et al. (1951)

Enthielt die Probelösung die Bestimmungsmethode störende Substanzen (z.B. Mercaptoethanol, DTE oder EGTA), so wurden das Protein vor der Bestimmung mit 10% TCA gefällt (Endkonzentration von 5% TCA). Nach 10 min Stehen auf Eis zentrifugierte man 2 min in der Kleinzentrifuge ab und nahm den Niederschlag in 1% SDS, 0,1 N NaOH auf. Von dieser Stammlösung wurden dann mehrere Verdünnungen angefertigt und später der Mittelwert der sich hieraus ergebenden Proteinkonzentrationen gebildet. Die Durchführung des Proteintestes erfolgte im Autoanalyzer II (Technikon, Bad Vilbel). Ein Aliquot der Proteinprobe wurde bei Raumtemperatur, mit einem gleichem Volumen 0,1% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,24% Dinatriumtartrat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ vermischt. Eine Minute später erfolgte der Zusatz eines 4,25fachen Volumens an 0,2 N NaOH, 2,12% Na_2CO_3 , nach einer weiteren Minute der Zusatz eines gleichen Volumens an Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:4 verdünnt, Merck, Darmstadt). Nach fünf Minuten wurde die Extinktion bei 660 nm (im Durchflußphotometer) bestimmt. Die Eichung des automatischen Tests erfolgte für jede Messung mit zwei BSA-Standards (50 und 100 $\mu\text{g/ml}$) vor den zu messenden Proben und zwei dahinter. Aus diesen bildete man den zur Berechnung der Proteinkonzentrationen benötigten Mittelwert der Standards.

2.6.2 Bestimmung der Phosphatkonzentration im automatisierten Test nach FISKE & SUBBAROW (1925)

Im Schlauchsystem des Technikon-Autoanalyzers wurden 0,01% SDS, 0,27% Ammoniumheptamolybdat, 0,55 N H_2SO_4 (als Stopplösung) und 7,44% NaHSO_3 , 0,25% Na_2SO_3 , 1,25% 1-Amino-2-hydroxynaphtalin-sulfon-

säure (ANSA-Reagenz) im Volumenverhältnis 1:6 ca. 2 min lang gemischt. Darauf erfolgte die Zugabe der Probe (0,2 ml, verdünnt in 7,5% SDS) im Volumenverhältnis 1:4,15 zur Reagenzienmischung, und nach weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde im Durchflußphotometer die Extinktion bei 660 nm gemessen. Die Eichung erfolgte mit Phosphatstandardlösungen.

2.6.3 Bestimmung der enzymatischen Glykogen-Phosphorylase Aktivität im Autoanalyzer nach HASCHKE & HEILMEYER (1972)

Der Test ist dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymreaktion unter Testbedingungen in Richtung des Glykogen-Aufbaues verläuft, wobei die Konzentration des freigesetzten Phosphates gemessen wird.

Dazu wurden im Schlauchsystem des Autoanalyzers (Technikon) gleiche Volumina der Enzymprobe (Enzymverdunnungspuffer: 10 mM GP, 50 mM ME, 5 mg/ml BSA (SERVA, Heidelberg), 0,01% NaN₃, pH 6,8) und der Substratlösung (siehe unten) vermischt und 10 min bei 30°C inkubiert (thermostatisierte Inkubationsspirale). Für den Phosphorylase a-Test enthielt die Substratlösung 100 mM Natriummaleat, 150 mM Glucose-1-Phosphat, 2% AMP-freies Glykogen, 0,01% Triton-X 100, pH 6,8. Für den Phosphorylase b-Test enthielt die Substratlösung noch zusätzlich 2 mM AMP. Die Enzymreaktion wurde durch Verdünnen in ca. 45fachem überschuß an 0,28% Ammoniumheptamolybdat, 0,01% SDS, 0,55 N H₂SO₄ gestoopt. Nach Zusatz von 1/20 des Volumens an 0,125% ANSA, 7,44% NaHSO₃, 0,25% Na₂SO₃ wurde nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur in der Durchflußküvette bei 660 nm die Extinktion gemessen. Die Berechnung der enzymatischen Aktivität geschah nach folgender Formel:

$$EA (\mu\text{Kat/ml}) = E_{660 \text{ nm}} \times VF / (E_{660 \text{ nm}}(1\text{mM P}_i) \times k)$$

EA: Enzymaktivität, $E_{660 \text{ nm}}$: Extinktion der Probe bei 660 nm, VF: Verdünnungsfaktor, $E_{660 \text{ nm}}(1\text{mM P}_i)$: Extinktion einer 1mM Phosphatlösung, k: apparativ bedingte Konstante, die die Umrechnung in die Einheit ' $\mu\text{Kat/ml}$ ' bewirkt, k wurde durch manuelle Tests ermittelt und der Autoanalyzer so kalibriert ($k=0,45$).

2.6.4 Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase im automatischen Test nach JENNISSEN & HEILMEYER (1974)

Die Idee dieses Tests ist, daß durch die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe des ATP auf Phosphorylase b, synchron mit diesem Transfer die Aktivität der Phosphorylase a zunimmt. Dabei wird diese Aktivitätszunahme verfolgt.

Die Inkubation erfolgte bei 30°C in einer thermostatisierten Inkubationsspirale des Technikon-Autoanalyzers.

Im Schlauchsystem des Testautomaten wurden gleiche Volumina folgender Lösungen gemischt:

1) 3mM ATP, 20 mM Magnesiumacetat, 0,3 mM CaCl_2 , 125 mM Tris, 125 mM GP, 40 mM ME, 0,01% Triton-X 100, pH 6,8 bzw. 8,2.

2) 5 mg/ml AMP-freie Phosphorylase b, 3% Glykogen, 0,01% Triton-X 100, 25 mM ME, 10 mM GP, pH 7,0.

3) Enzymprobe (Kinaseverdünnungspuffer: 10 mM GP, 1mM DTE, 5 mg/ml BSA (SERVA, Heidelberg), 0,01% NaN_3 , pH 6,8).

Nach 5 min wurde die Enzymreaktion durch ca. 100faches Verdünnen mit 100 mM Natriummaleat, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 10 mM ME, 0,05% NaN_3 , 0,01% Triton-X 100, pH 6,8 abgestoppt. Von der verdünnten Reaktionslösung wurde dann ein Aliquot gezogen und dem Schlauchsystem für die Durchführung des Phosphorylase a-Tests (2.6.3) zugeführt. Die Eichung erfolgte mit Phosphatstandardlösungen. Eine 1 mM Phosphatlösung lieferte eine Extinktion, die einer Phosphorylase Kinase-Aktivität von 11,6 pKat/ml bei pH 6,8 bzw. 26,0 pKat/ml bei pH 8,2 entsprach.

Berechnung: $\text{EA (nKat/ml)} = E_{660 \text{ nm}} \times \text{VF} \times F(\text{pH}) / E_{660 \text{ nm}}(1 \text{ mM P}_i)$

Hierbei stellt $F(\text{pH})$ den vom Meß-pH-Wert abhängigen Kalibrierfaktor für den Autoanalyzer dar: $F(\text{pH } 6,8) = 0,00887$, $F(\text{pH } 8,2) = 0,01462$.

Die typischerweise erhaltene spezifische Enzymaktivität betrug 133

$n\text{Kat}/\text{mg} = 8000 \text{ nmol}/(\text{mg} \times \text{min})$ ("U/mg").

2.6.5 Aktivierung der Phosphorylase Kinase im automatischen Test nach COHEN (1980) und BÖHM & JENNISSEN (1985)

Zur Aktivierung der Phosphorylase Kinase wurde diese in ihrem Verdünnungspuffer (2.6.4) auf $1,25 \mu\text{g}/0,9 \text{ ml}$ Endkonzentration eingestellt. Zuvor stellte man das zu testende Calmodulin mit CaM-Puffer auf 10,30, 50 und dann in Schritten zu je $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ bis $750 \mu\text{g}/\text{ml}$ ein. Nun legte man in einem Autoanalyserhütchen (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) $90 \mu\text{l}$ Phosphorylase Kinase-Lösung vor, gab $10 \mu\text{l}$ der Calmodulinlösung hinzu und vermischte innig mit der Pipette. Hierdurch resultierten Calmodulin-Konzentrationen von $1-75 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($6-449 \text{ nmol/l}$) im Aktivierungsansatz. Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und dann im automatischen Test die Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase bei pH 6,8 gemessen (2.6.4). Zur Bestimmung der Grundaktivität a_0 wurde vor und hinter der Calmodulin-Kinase-Aktivierungsmeßreihe eine Kinaselösung verwendet, die anstelle von Calmodulin $10 \mu\text{l}$ CaM-Puffer enthielt und aus allen sechs Werten die Grundaktivität (A_1) durch Mittelwertbildung bestimmt.

Ein Maß für die Aktivierung der Phosphorylase Kinase war der sogenannte Aktivierungsgrad $AG = (A - A_1)/A_1$.

2.6.6 Bestimmung der Glykogenkonzentration nach MONTGOMERY (1957)

Zunächst löste man 40 g Phenol in 10 ml Wasser (stets frisch ansetzen). Dann wurden 2 ml Probe in einem 200ml-Weithalserlenmeyerkolben vorgelegt, 5 ml konzentrierte Schwefelsäure im Schuß zupipettiert (mit Pipettierhilfe "blasen"), dann zunächst vorsichtig und später innig gerührt. Diese Reaktionslösung wurde dann in Einmalküvetten, in einem Photometer der Firma Pharmacia-LKB (Freiburg) bei 420 nm gemessen. Mit

Glykogenkonzentrationen von 5-60, $\mu\text{g/ml}$ wurde eine Eichkurve erstellt. Diese war im gesamten Meßbereich linear ($r^2=0,96$). Die Steigung der Regressionsgeraden betrug $0,260 \pm 0,001$ und der Ordinatenabschnitt war $0,011 \pm 0,001$.

2.6.7 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

2.6.7.1 SDS-PAGE nach LÄMMLI (1970)

Lösungen:

- 1) 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Methylenbisacrylamid
- 2) 1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
- 3) 0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
- 4) TEMED
- 5) 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (frisch angesetzt)

Die Ansätze für Gele unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentrationen setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung	Polyacrylamid-Konz.		
	4,5%	10%	15%
1)	1,5 ml	10 ml	15 ml
2)	/	7,5 ml	22,5 ml
3)	10 ml	/	/
4)	0,02 ml	0,03 ml	0,03 ml
5)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	6 ml	12,5 ml	7,5 ml

* Diese Konzentration wurde ausschließlich für das Sammelgel benötigt.

Zum Gießen der Gele benutzte man vertikale Glasplatten der Größe 10 x 20 cm. Der Abstand zwischen den Platten betrug 1,5 mm. Sämtliche Abstandshalter, sowie der Elektrophorese-Kamm bestanden aus Makrolon und wurden in der hiesigen Werkstatt nach eigenen Wünschen und Maßen angefertigt. Der taschenbildende Elektrophorese-Kamm besaß 16 Zähne, der Zahnabstand betrug 1,6 mm, die Zahnbreite war 6,6 mm und die Zahntiefe betrug 14,8 mm. Damit ergab sich ein theoretisches Schachtvolumen von 147,ul. In der Praxis paßten jedoch aufgrund der Gelschrumpfung lediglich ca. 100,ul in eine Geltasche.

Die Platten wurden zunächst mit Abstandhaltern versehen, mit Klammern fixiert und dann mit 1% Agarose von außen abgedichtet. Dann füllte man zunächst, nach mehrmaligem Entgasen im Wasserstrahlvakuum, die Trenngelmischung ein, überschichtete mit Wasser und ließ das Gel polymerisieren. Anschließend wurde das Sammelgel darüber polymerisiert und vorsichtig, ohne Blasenbildung, der Kamm zwischen die Platten in die Gelmischung eingesetzt. In der Regel wurden vier Gele gleichzeitig gegossen.

Als Kammerpuffer diente: 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin und 0,1% (w/v) SDS pH 8,3. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 min bei 100°C in Probenpuffer (20% Glycerin, 5% ME, 2% SDS, 0,001% Bromphenolblau, 0,065 M Tris/HCl, pH 6,8, erhitzt).

Die Laufzeit der Gele betrug ca. 50 min bei 100 mA und 300 V.

2.6.7.2 Calcium-abhängige SDS-PAGE nach WILLIAMS et al. (1984)

Zur Demonstration der Calcium-abhängigen elektrophoretischen Mobilität von Calmodulin bzw. seinen Derivaten wurde als Grundsystem die PAGE nach LÄMMLI (1970) benutzt. Es unterschied sich von der im vorigen Kapitel beschriebenen Elektrophorese-Technik dadurch, daß der normale LÄMMLI-Probenpuffer gegen einen Calcium-haltigen und einen Calcium-freien Probenpuffer ausgetauscht wurden. Der erstere hatte folgende Zusammensetzung: 10% Glycerin, 5% ME, 2% SDS, 0,001% Bromphenol-

blau, 0,8 mM CaCl_2 , 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8. Der Calcium-freie bestand aus den selben Komponenten, jedoch war das Calciumchlorid durch 10 mM EGTA ersetzt.

Zur Durchführung dieser Elektrophorese wurden drei Aliquote einer Calmodulin-Probe wie folgt aufgenommen: Das erste in $-\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, die beiden anderen in $+\text{Ca}^{2+}$ -Puffer. Dann wurden sie in der selben Reihenfolge in die Geltaschen überführt, ein Schacht freigelassen und die nächsten drei einer anderen Probe aufgetragen usw. . Das Verfahren funktionierte auch dann, wenn nur zwei Spuren, eine mit und eine ohne Calcium-Ionen benutzt wurden.

Die Gele wurden dann unter den selben Bedingungen gefahren, wie zuvor beschrieben. Nach dem Anfärben zeigten sich dann "sigmoide" Banden, da die Ca^{2+} -Form des Calmodulins weiter wandert als die Calcium-freie Form.

Wurden die Calcium-Ionen durch 2 mM La^{3+} ersetzt, so ergaben sich manchmal noch größere "Sprünge" (Abb. 4).

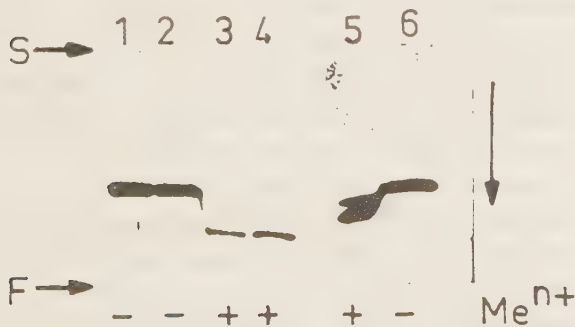


Abb. 4: SDS-PAGE von Calmodulin aus Rinderhoden nach WILLIAMS et al. (1984), Coomassie-Färbung.

S = Start, F = Front, der vertikale Pfeil gibt die Laufrichtung an, $+\text{Me}^{n+}$ gibt an, ob Metallkationen zugesetzt wurden oder nicht. Folgende Metallkationen wurden eingesetzt: Spur 3 und 4: La^{3+}

Spur 5: Ca^{2+}

Deutlich ist der im Vergleich zum "Calcium-Sprung" größere Lanthan-Effekt zu sehen.

2.6.7.3 Färben und Entfärben der SDS-Gele

Die Gele wurden 30 bis 60 min in 0,25% (w/v) Coomassie-Blau (SERVA Blue R, SERVA, Heidelberg), 50% (v/v) Methanol, 9,2% (v/v) Essigsäure auf einem Schütteler gefärbt und anschließend in 7,5% (v/v) Essigsäure, 7,5% (v/v) Methanol ebenfalls unter ständigem Schütteln entfärbt und gelagert. Die Entfärbelösung wurde nach dem Entfärben über Aktivkohle regeneriert und wiederverwendet.

2.6.7.4 Dokumentation der SDS-Gele

Die SDS-Gele wurden 10 min im Durchfluß gewässert um die toxische und korrosive Entfärbelösung auszuspülen. Dann wurden sie auf eine Glasplatte gelegt und bis zu den Gelrändern mit schwarzen Gummimatten abgedeckt und im Durchlicht (Neonrohren, Kaltton) mit einer Kleinbildkamera mit Makroobjektiv, bei manueller Belichtungsmessung, fotografiert (Blende: 8, 11, 16 bei 1/4 bis 1/8 s Verschußzeit). Als Film benutzte man orthochromatischen, steil arbeitenden Dokumentenfilm (Agfaortho 25 Professional, mit 15 DIN Empfindlichkeit, konfektioniert als Meterware Fa. AGFA-GEVAERT, Leverkusen). Der Film wurde sofort danach in 1:10 verdünntem Neutol NE (Die Neutol NE-Stammlösung, AGFA-GEVAERT, wurde unter Stickstoff verwahrt), 5 min bei 23°C unter ständiger Bewegung im Tageslicht-Entwicklungstank entwickelt, der Prozeß 1 min mit 2% Essigsäure gestoppt und dann 1 min in einem Schnellfixierbad (Acidofix Quick, Ilford Ltd, Sussex, England) fixiert. Der Film wurde dann 15 min unter fließendem Leitungswasser gespült, 1 min in einem Netzbad von 1% SDS geschwenkt, abgestreift und dann getrocknet. Die Positiv-Abzüge wurden von einem Fotolabor angefertigt.

2.6.7.5 Anfertigen von Autoradiogrammen

Die nicht getrockneten SDS-Gele wurden im Isotopenlabor in Polyethylenfolien eingeschweißt und auf einen Röntgenfilm (18x24 cm, Fuji RX,NIF, Fa. Fuji, Düsseldorf) gelegt. Nach der Exposition von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen wurden die Planfilme bei Raumtemperatur 5 min in Röntgenentwickler (Adefo, Nürnberg), unter Rotlichtbeleuchtung, entwickelt, in 2% Essigsäure während 1 min gestoppt und anschließend 3 min in einem Röntgenfixierbad (Adefo) fixiert, 15 min in Aqua bidest. gewässert und an der Luft getrocknet.

2.6.8 Radioaktivitätsmessung

2.6.8.1 Messung der Gammastrahlung von ^{125}I -markierten Proteinen

Sämtliche Gammazählungen wurden in einem Gerät der Fa. Packard, Frankfurt (Auto Gamma 500) durchgeführt. Routinemäßig wurde ein Energiefenster von 15 bis 80 KeV und 1 min Zählzeit benutzt.

In der Regel wurden die zu zählenden Proben zunächst mit einer 25 mg/ml BSA-Lösung (Roth, Karlsruhe) auf 2 mg/ml BSA-Endkonzentration eingestellt und dann mit dem selben Volumen wie die Probe mit 10% TCA versetzt, 10 min auf Eis inkubiert, in der Kleincentrifuge pelletiert und das Pellet in 1% SDS, 0,1 N NaOH aufgenommen und dann gezählt.

Da aus den Gammazählungen bei der Poolbestimmung der Calmoduline quantitative Rückschlüsse gezogen werden sollten, mußten zwei Kontrollen zur Abhängigkeit der Zählausbeute in ^{125}I -CT-CaM vom Volumen und von der in der Probe enthaltenen Proteinmenge durchgeführt werden:

1) Es wurde je zweimal 10, μl CT-CaM-Lösung (598 ± 32 CPM/ μl) vorgelegt und steigende Mengen eines Puffers, der alle Substanzen enthielt, aus denen Calmodulin im allgemeinen TCA-gefällt wurde (300 mM NaCl, 20

mM Tris/HCl, 10 mM EGTA, 2 mg/ml BSA, pH 7,5) von 0,01 ml - 1,0 ml zugegeben und dann im Gammacounter gezählt. Dabei stellte sich in insgesamt 20 Messungen (10 Doppelbestimmungen) heraus, daß sich mit einer Abweichung von 5,6% stets der reproduzierbare Meßwert von 5977 ± 318 CPM ergab (Abb. 5); also unabhängig von der zugegeben Proteinmenge, sowie dem hinzupipettierten Volumen war.

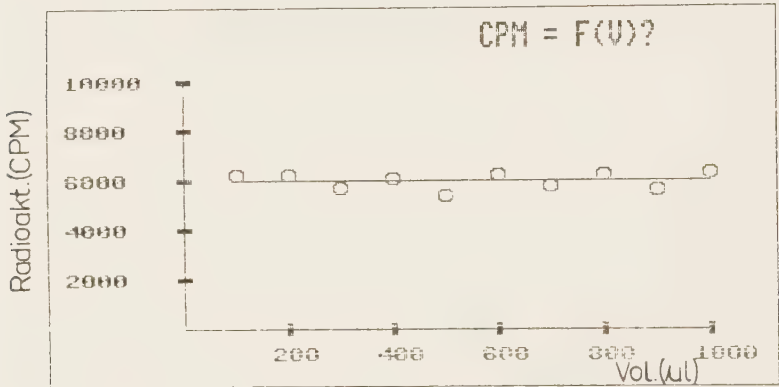


Abb. 5: Zur Unabhängigkeit einer vorgelegten ^{125}I -Radioaktivitätsmenge vom zugesetzten Volumen. Es wurden 0,01 ml CT-CaM (5977 ± 318 CPM) vorgelegt und 0,1-1,0 ml Puffer (300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10 mM EGTA, 2 mg/ml BSA, pH 7,5) zugegeben und dann die ^{125}I -Radioaktivität in CPM gemessen.

2) Zur Untersuchung des Linearitätsbereichs der ^{125}I -Messung wurden unterschiedliche Volumina der CT-CaM-Stammlösung vorgelegt und darin die Gammastrahlung gemessen. Dabei zeigte sich, daß im interessierenden Bereich von einigen hundert CPM bis ca. 700.000 CPM ein linearer Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9999 vorlag; also die Gammastrahlungsmessung auch in dieser Hinsicht unproblematisch war (siehe Abb. 6). Da alle Proben vom Gammazähler statistisch um ihre Längsachse

rotiert wurden, konnten hierdurch auch Probleme, die sich aus der Zählgeometrie ergeben könnten (JAENICKE, 1966; FREIFELDER, 1982), negiert werden.

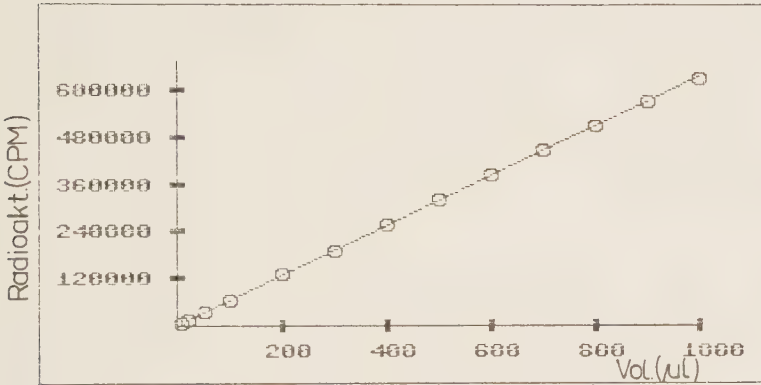


Abb. 6: Zur Linearität und Geometrie der ^{125}I -Radioaktivitätsmessung.
Es wurden steigende Volumina der CT-CaM-Stammlösung vorgelegt, darin die Radioaktivität gemessen und eine lineare Regression gerechnet ($r^2=0,9999$).

Die absolute Zählausbeute betrug ca. 70%.

Falls es zum Vergleich zweier oder mehrerer Proben erforderlich war, wurde die ^{125}I -Radioaktivität auf einen gemeinsamen Zeitpunkt unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von 60 d (WEAST, 1977) bezogen. Bei den Poolbestimmungsuntersuchungen wurden in der Regel Tracer und Endprodukte am selben Tag miteinander gemessen, sodaß sich eine Halbwertszeitkorrektur erübrigte.

2.6.8.2 Messung der Radioaktivität in $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -doppelmarkierten Proteinen

Es wurde eine Flüssigszintillationszählung nach HAYES & GOULD (1953) durchgeführt. Als Szintillationszähler diente ein kühlbarer Tri-Carb 4530 (Fa. Packard, Frankfurt). Für die Messung von ^3H und ^{14}C in ein und derselben Probe wurden folgende apparativen Parameter gewählt:

Energiebereich ^3H : 0 - 10 KeV

Energiebereich ^{14}C : 12 - 156 KeV

Zählzeit: 20 min

Zählzyklus: 3 - 5

2 Sigma: 0,2%

Background-Korrektur: automatisch (15 ml Szintillator/0,5ml 0,01% SDS)

Jede zu messende Probe (0,1-2,0 ml) wurde in 0,01% SDS überführt. Dann wurden je Probe 15 ml Quickszint 212 (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt) in ein gläsernes Gefäß zur Flüssigszintillationszählung (mit Schraubverschluß und Alukappe im Deckel, Fa. Zinsser Analytic GmbH) vorgelegt und ein Aliquot der Probe hineinpipettiert, kräftig geschüttelt, danach optisch auf Homogenität überprüft und anschließend bei 8°C gemessen. Während des ganzen Untersuchungszeitraumes wurden lediglich zwei Chargen Szintillator verwendet (Batch-Nr.: 6170 und 7029).

Bei doppelmarkierten Proteinen müssen die Isotope ^3H und ^{14}C , die mit einer unterschiedlichen Ausbeute gemessen werden, in einer Probe nebeneinander bestimmt werden. Zur Ermittlung der absoluten Zerfälle wurden deshalb für jedes Isotop und für jede Szintillator-Charge eine Quenchkurve mit Hexadekan-Standards (PENG, 1977) der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig aufgenommen. Dazu wurde aus einer Stammlösung des jeweiligen Isotops eine definierte Menge Radioaktivität mit einer Hamilton-Pipette vorgelegt (je eine pro Isotop, Spülung mit 1%SDS, dann Aceton um Kontamination mit Resten zu vermeiden) und anschließend

steigende Volumina (0,1 bis 2,0 ml) einer 0,01% SDS-Lösung hinzugegeben, nachdem zuvor die Zählung ohne Quenchflüssigkeit durchgeführt worden ist. Auf diese Weise wird eine verschieden starke Verschiebung der Energie des Emissionsspektrums erreicht, aus der die Quencheffekte errechnet werden können. In Abb. 7 ist der Logarithmus des apparativ ermittelten Quenchparameters (für jedes gemessene Isotop), bei dem benutzten Instrument als SIE (Spectral Index of External Standard) bezeichnet, gegen den Quenchfaktor aufgetragen (KAMP & BLANCHARD, 1971). Dabei ergibt sich die dimensionslose Zahl SIE (Wertebereich von 0-1000) als Verhältnis der Bestrahlung einer zu messenden Probe mit einer im Counter eingebauten ^{226}Ra -Quelle und dem sich ohne Probe ergebenden Radium-bedingten Wert.

Der Quenchfaktor (QF) ist definiert als Verhältnis der eingesetzten Radioaktivitätsmenge (ohne Quenchflüssigkeitszusatz) in DPM_0 und dem nach der Quench-Lösungsmittelzugabe erhaltenen Radioaktivitätsmenge in CPM_v :

$$\text{QF} = \text{DPM}_0 / \text{CPM}_v \quad (2)$$

Demnach errechnet sich für jedes Isotop, bei bekanntem Quenchfaktor QF die absolute Radioaktivität in einer zu messenden Probe in DPM zu:

$$\text{DPM}_{\text{Probe}} = \text{QF} \times \text{CPM}_{\text{Probe}} \quad (3)$$

In Abb. 7 wurde $\ln \text{SIE} = a + b \times \text{QF}$ durch lineare Regression erhalten. So ließ sich bei bekanntem Quench über die Regressionsparameter a und b der entsprechende Quenchfaktor ermitteln.

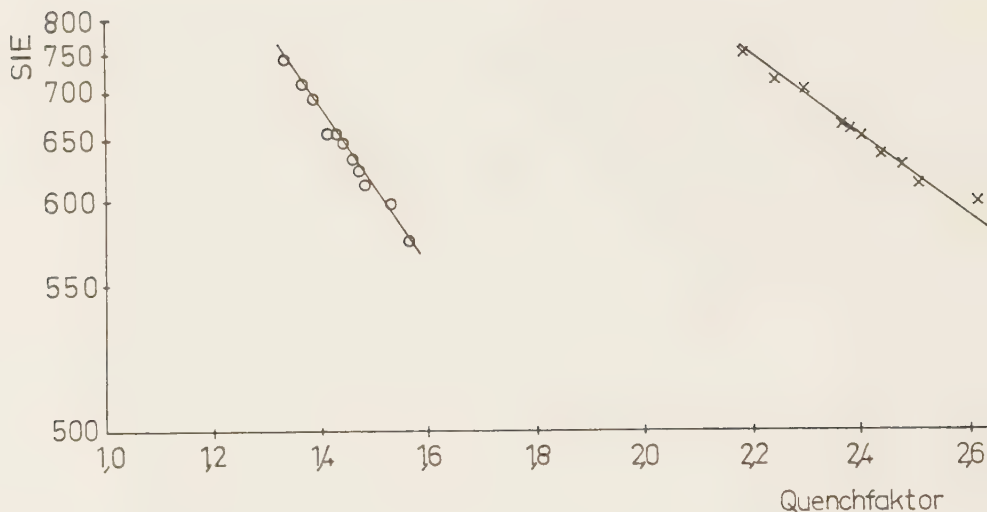


Abb. 7: Quenchkurven für ^3H und ^{14}C (halblogarithmische Darstellung).

SIE ist der apparative Quenchparameter (siehe Text). Als Standard diente Hexadecan, entweder Tritium-markiert oder ^{14}C -markiert. Als quenchendes Lösungsmittel wurde in den Szintillator (15 ml) 0,1 ml-2,0 ml 0,01% SDS gegeben.

Die Quenchkurven haben die lineare Form: $\ln \text{SIE} = a + b \times \text{QF}$

Für ^3H ergaben sich folgende Werte :

$a = 7,689 \pm 0,08$; $b = -0,503 \pm 0,03$; $r^2 = 0,96$

Für ^{14}C :

$a = 8,217 \pm 0,09$; $b = -1,205 \pm 0,06$; $r^2 = 0,98$

×—× : ^3H -Quenchkurve

○—○ : ^{14}C -Quenchkurve

Alle Angaben beziehen sich auf den Szintillator Quickszint 212 mit der Batch-Nr. 6170.

Bei $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -doppelmarkierten Proteinproben genügen jedoch die Quenchkurven nicht zur Bestimmung der absoluten Tritiumzerfälle. Hier muß noch zusätzlich berücksichtigt werden, daß stets ein Teil der im ^{14}C -Kanal gemessenen Radioaktivität im ^3H -Kanal erscheint (Overspill), wobei der Anteil der im ^3H -Kanal auftretenden Strahlung vom aktuellen Quench der Probe abhängt. Daher wurde die Quenchkurve mit den ^{14}C -Standards gleichzeitig im ^3H -Kanal (0-10 KeV) mit gemessen und eine lineare Beziehung ($r^2=0,97$) zwischen dem Anteil der ^{14}C -Radioaktivität, der im ^3H -Kanal erscheint und dem Quench (SIE) der Probe ermittelt (vergleiche Abb.8 und 9).

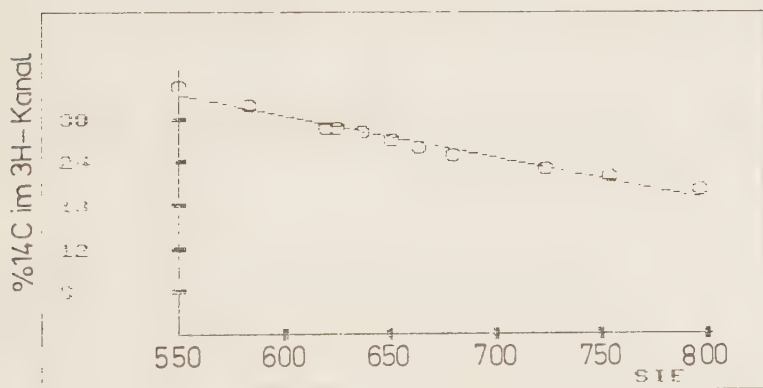


Abb. 8: Quench-abhängiger Overspill vom ^{14}C -Kanal (12-156 KeV) in den ^3H -Kanal (0-10 KeV).
SIE = apparatives Quenchverhältnis

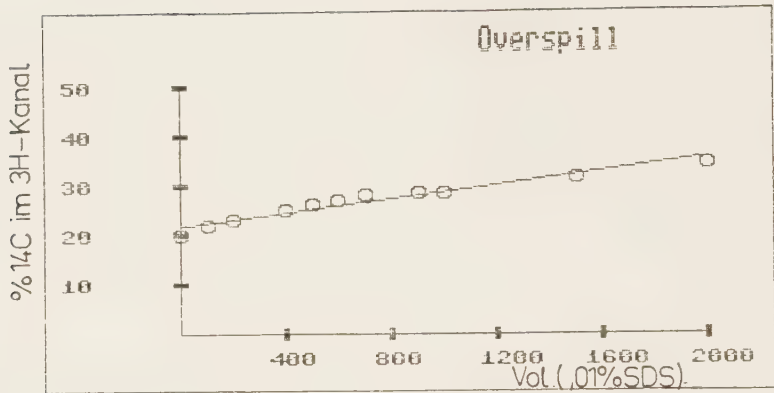


Abb. 9: Abhängigkeit des Overspills vom Volumen des zugegebenen Lösungsmittels.

Damit verläuft die Bestimmung der DPM-Werte und des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten in einer doppelmarkierten Probe folgendermaßen:

1. Messung der CPM-Daten und Quenchparameter (SIE)
2. Bestimmung der absoluten ^{14}C -Zerfälle in DPM aus der entsprechenden Quenchkurve
3. Ermittlung des Overspill-Anteils aus dem Probenquench und den ^{14}C -DPM-Werten
4. Overspillkorrektur der ^3H -CPM-Werte
5. Berechnung der ^3H -DPM-Daten
6. Bildung des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnoverquotienten aus den DPM-Daten

Die zuvor beschriebenen Quenchkurven, sowie die Overspillkorrektur wurden für jede Szintillator-Charge neu bestimmt.

In der Literatur wurde berichtet, daß die Methode des internen Standards bei einer zugegebenen Radioaktivitätsmenge, die über derjenigen liegt, die gemessen werden soll, die genaueste Methode (HERBERG, 1963; ROGERS, 1966) sei. Mit dem hier gezeigten Verfahren konnte teilweise eine bis zu 100%-ige Übereinstimmung mit einem internen Standard erreicht werden. Da außerdem die Durchführung einer Vielzahl von Messungen doppelmarkierter Proben mit internem Standard einen unverhältnismäßig großen Aufwand bedeutet und zudem eine Menge Fehlermöglichkeiten beinhalten kann (PENG, 1977), wurden sämtliche Daten der vorliegenden Arbeit über die zuvor beschriebene Methode des externen Standards bestimmt. Dabei war es jedoch wichtig, daß alle Calmodulin-Proben sofort nach der Isolierung vermessen wurden, da sonst, aufgrund nicht näher bekannter Prozesse, unbrauchbare Resultate, die Folge waren.

2.6.8.3 Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse der Turnover-Quotientenunterschiede

Zu den in der vorliegenden Arbeit angegebenen Standardfehlern (insbesondere der Turnoverquotienten, sowie deren prozentuale Differenzen), also dem mittleren Fehler des Mittelwerts einer Meßreihe, muß folgendes bemerkt werden:

1. Für jedes durchgeführte Turnoverexperiment (insgesamt sechs zu fünf unterschiedlichen ^3H -Inkorporationszeiten) wurden vier ausschließlich männliche Tiere des Kaninchen-Inzuchtstammes "Weiße Neuseeländer" eingesetzt. Diese Tiere wurden alle unter gleichen Bedingungen gehalten (siehe 2.4).

2. Es liegen jeweils für jeden Quotienten 5-16 Einzelmessungen an mindestens zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen vor. Der maschinelle Zählfehler für die Einzelmessung liegt aufgrund der langen Zählzeit von 20 min zwischen 0,2 und 1,8 %, wobei die zu zählenden Impulse (CPM-Werte) in der Regel mehr als das zehnfache über dem Leerwert liegen.

3. Die zur Umrechnung der in "CPM" ausgedrückten Maschinenimpulse in Zerfälle pro Minute, ausgedrückt in "dpm" benutzten Batch-spezifischen Quenchkurven wurden mittels internen $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Leucin bzw. $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Hexadecan-Standards überprüft und eine 99-100%-ige Übereinstimmung gefunden.

4. Die aus den Zerfallsdaten ermittelten Standardfehler der Turnoverquotienten wurden dann für die Quotientenbildung nach FENNER (1931) und SACHS (1983) korrigiert.

5. Die durch die Differenzbildung mitveränderten Standardfehler der Turnoverquotienten bei der Bestimmung der Abweichungen der einzelnen Quotienten voneinander, wurden ebenfalls nach FENNER und SACHS korrigiert.

Signifikanzteste der Quotientenunterschiede:

Da die Turnover-Quotienten die Anforderung des Datenniveaus einer Verhältnisskalierung erfüllen, also ein echter Nullpunkt existiert (keine Markierung mit ^{14}C -Leucin, dann ist $Q=0$) wurden hierzu verschiedene zweiseitige (MÜLLER et al., 1983; SACHS, 1983) Varianten des "t-Tests" benutzt:

1. Es wurde geprüft, ob alle erhaltenen Calmodulinquotienten eines Tages Streuungen um ein und denselben Mittelwert darstellen.

2. Es wurde geprüft, ob paarweise Meßreihen der Calmodulinquotienten sich signifikant unterscheiden (Es liegen sogenannte "gepaarte Beobachtungen" vor, da sich alle Meßwertvergleiche auf einunddenselben Tag und einunddasselbe Tierkollektiv beziehen).

Zur weiteren Sicherheit wurden die bei den Testen erhaltenen Freiheitsgraden noch halbiert und diejenigen Turnover-Quotienten als signifikant verschieden angesehen, die ein Signifikanzniveau von 2% (p unter 0,02) zeigten.

2.7 Computergrafiken

Die nicht-fotografischen Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem selbst geschriebenen Plotprogram (PLOT 3.2) erstellt. Als Programmiersprache diente ein BASIC-Dialekt mit einigen PASCAL-Elementen, sodaß eine strukturierte Programmierung gewährleistet war. Das Programm beinhaltete verschiedene Numerik-Routinen, z.B. lineare Regression, nichtlineare Anpassung einer Punkteschar an die Michaelis-Menten Gleichung (MICHAELIS & MENTEN, 1913) nach CLELAND (1967), sowie die Möglichkeit die Grafiken auf Bildschirm und Drucker auszugeben, inklusive einer sinnvollen Dateiverwaltung (sequentielle Dateien).

Als Hardwareausrüstung diente ein C-64 der Fa. Commodore (Frankfurt), inklusive Diskettenlaufwerk und ein 9-Nadel-Matrix-Drucker (FX-80, EPSON, Düsseldorf).

2.8 Elektronische Chromatographie-Überwachung

Es wurde eine elektronische Schaltung zur automatischen Abschaltung von Säulenchromatographieläufen, in Abhängigkeit von noch vorhandenem Laufpuffer, aufgebaut. Diese Schaltung diente zum Ausschalten der Chromatographiepumpe, sobald der Puffervorratsbehälter leer war. Dadurch wurde ein Trockenlaufen der empfindlichen Chromatographiegele verhin-

dert. Die Schaltung sprach ebenfalls auf störungsbedingtes Auftreten von Luftblasen (über ca. 0,5 ml) im Säulenzulaufsystem, an. Die im Anhang (siehe 7.1) näher beschriebene Schaltung wurde zu folgenden Zwecken eingesetzt:

Nacht- und Dauerbetrieb vorwiegend großvolumiger Säulen (z. B. Sepharose 4B bei der Isolierung der Phosphorylase Kinase), halbautomatischer Auftrag großer Mengen (über 100 ml, z.B. Auftrag des 4B-Pools auf Ionenaustauschgel), zeitsparende Regeneration großvolumiger Säulen und Vorlage eines definierten Puffervolumens und daher kostenreduzierend bei teuren (z.B. Leupeptin-haltigen) Puffern.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der Poolgröße des Calmodulins

Es war ein Teil der vorliegenden Arbeit, die gesamte Calmodulinmenge im Kaninchenskelettmuskel zu bestimmen und eine Differenzierung potentiell verschiedener Pools zu erkennen. Um dieses Problem zu lösen, wurden Isotopenverdünnungsexperimente durchgeführt (siehe 2.3).

Anschließend wird Calmodulin, wie in Kapitel 2 beschrieben, auf drei verschiedene Arten isoliert. Dann bestimmt und vergleicht man die spezifischen Radioaktivitäten der so erhaltenen Calmoduline. Der Vorteil dieses Untersuchungskonzeptes liegt darin, daß hierdurch gleichzeitig die Calmodulin-Menge und, zumindest in vitro, die Verteilung gemessen werden kann.

3.1.1 Kriterien für die Wahl der Iodierungsmethode

Die ausgewählte Iodierungsart sollte ein ^{125}I -Calmodulin liefern, welches sich bei allen Reinigungsschritten so verhält wie das native, weil die Möglichkeit besteht, daß das Bindungsverhalten an Geloberflächen mit der biologischen Aktivität korreliert sein könnte. An Iodierungsverfahren kamen zunächst die relativ schonende Methode (CHAFOULEAS et al., 1979) nach BOLTON & HUNTER, 1973 sowie die schnelle und effiziente, jedoch invasive (CHAFOULEAS et al., 1979; GOPALAKRISHNA et al., 1985) Prozedur durch Oxidation von Na^{125}I mit Cloramin T (HUNTER et al., 1962) in Frage. Beide Verfahren wurden ausprobiert und führten zu den im Folgenden vorgelegten Ergebnissen.

3.1.2 Teste zur Verwendbarkeit verschiedener Calmodulin-Derivate

Einer der wichtigsten Schritte bei der Isolierung von Calmodulin ist die Ca^{2+} -abhängige Affinitätschromatographie. In einer sich daran anschließenden Ionenaustauschchromatographie wird es dann in elektro-phoretisch reinem Zustand gewonnen (2.1.5).

Daher wurden zunächst verschiedene Paare Iodcalmodulin - Chroma-tographiegel getestet: Ein Gemisch aus radioiodiertem und nicht iodiertem Calmodulin definierter spezifischer Radioaktivität wurde dann wie unter 2.1.5 beschrieben chromatographiert und die spezifi-sche Radioaktivität des Eluates gemessen und mit der des Auftrags verglichen. Im Falle gleichen Verhaltens sollten die beiden spezifi-schen Radioaktivitäten nur unwesentlich voneinander abweichen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Tab. 1 gezeigt.

CaM-Der.	Gelart	SR _{Auf.}	SR _{Elu.}	Abw.	Prot.- Ausb.	Rad.- Ausb.
		CPM/mg	CPM/mg	% v. Auf.	%	%
CT-CaM	FP-Seph.	96.920	102.688	+ 6,0	46,0	48,8
CT-CaM	PH-Seph.	105.620	132.864	+ 28,5	47,5	58,9
BH-CaM	PH-Seph.	132.517	67.580	- 51,0	65,0	33,1
BH-CaM	FP-Seph.	110.355	0	/	50,2	/
CT-CaM	DEAE-Cel.	465.909	479.315	+ 2,8	85,8	88,3

Tab. 1: Test der spezif. Radioaktivität vor und nach Chromatographie auf verschiedenen Gelen mit unterschiedlichen ^{125}I -Calmodulinderivaten. Vor jedem Säulenlauf wurde markiertes mit unmarkiertem CaM gemischt. Von dieser Mischung wurden 2 mg (100%-Wert für die Proteinausbeuteberechnung pro ml sedimentiertes Gel aufgetragen (Radioaktivitätsauftrag: ca. 2×10^5 bis 10^6 CPM, 100%-Wert für die Berechnung der Rad.-Ausbeute).

SR_{Auf.}: Spezifische Radioaktivität des aufgetragenen CaM-Gemisches.

SR_{Elu.}: Spezifische Radioaktivität des eluierten CaM.

CT-CaM: Nach der Chloramin T-Methode, (HUNTER et al., 1962) iodier-tes CaM.

BH-CaM: Nach BOLTON & HUNTER, 1973) radiomarkiertes CaM.

DEAE-Cel: Diethylaminoethyl-Cellulose (Pharmacia, Freiburg).

FP-Seph.: Fluphenazin-Sepharose (s. Methodenteil).

PH-Seph.: Phenyl-Sepharose (Pharmacia, Freiburg).

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigen nur die Systeme: CT-CaM mit Fluphenazin-Sephepharose und CT-CaM mit DEAE-Cellulose das erforderliche Verhalten: Die Abweichungen der spezifischen Radioaktivitäten der Eluate von der jeweils aufgetragenen betragen 3-6%. Daher kann man sagen, daß Calmodulin, welches nach der Chloramin T - Methode iodiert wurde, sowohl auf Fluphenazin-Sepharose als auch auf DEAE-Cellulose, im Rahmen der Meßgenauigkeit, genauso adsorbiert und eluiert wird wie unmarkiertes Calmodulin.

3.1.2.1 Untersuchungen zur Nativität verschieden iodierter Calmoduline

Ein sehr guter Hinweis für die noch erhaltene Flexibilität, also den Erhalt der Fähigkeit der Konformationsänderung in Gegenwart von Calcium ist die Ca^{2+} -abhängige elektrophoretische Mobilität (DEDMAN et al., 1983; WILLIAMS et al. 1984). Aus diesem Grunde wurde sowohl vom Bolton-Hunter-Derivat als auch vom Chloramin T iodierten Calmodulin ein SDS-Gel unter +/- Ca^{2+} -Bedingungen (s. 2.6.7.2) angefertigt. Nach dem Fixieren der Proteine, nach der Elektrophorese, in Entfärbelösung (2.6.7.3) wurde ein Röntgenfilm über das Gel gelegt und mehrere Stunden belichtet. Das so erhaltene Autoradiogramm beider CaM-Derivate ist in Abb.10 gezeigt.



Abb.10: Autoradiogramm eines 15%-igen SDS-Gels von Bolton-Hunter-CaM und mit Chloramin T iodiertem CaM unter +/- Ca^{2+} -Bedingungen. Pro Schacht wurden beim BH-CaM 4×10^5 CPM aufgetragen, beim CT-CaM 10^5 CPM, die Expositionszeit betrug 2,5 h. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an.

Durch dieses Autoradiogramm wird gezeigt, daß nur das Bolton-Hunter-markierte Calmodulin-Derivat noch einen Ca^{2+} -abhängigen "Sprung" zeigt, während das durch Oxidation mit Chloramin T iodidierte Protein auch in den mit Ca^{2+} beladenen Schächten auf gleicher Höhe wie die Bande ohne Ca^{2+} läuft, das bedeutet, daß im Falle der Chloramin T-Modifikation nur die Calcium-freie Konformation "eingefroren" wird. Das Resultat dieses Experimentes liefert bereits einen Hinweis auf die fehlende, für die biologische Aktivität wesentliche Calcium-abhängige Konformationsänderung des CT-CaM.

Die biologische Aktivität der dargestellten Calmodulin-Derivate wurde durch die Stimulierung der Phosphorylase Kinasaktivität bei pH 6,8 mit extern zugesetztem Calmodulin oder seinen nicht radioaktiv modifizierten Kontrollderivaten in Gegenwart von Ca^{2+} (siehe 2.6.5) (SHENOLIKAR et al., 1979 und COHEN, 1980), getestet. Die Aktivierungskurven für BH-CaM, CT-CaM und ein Kontroll-Calmodulin sind in Abb.11 gezeigt.

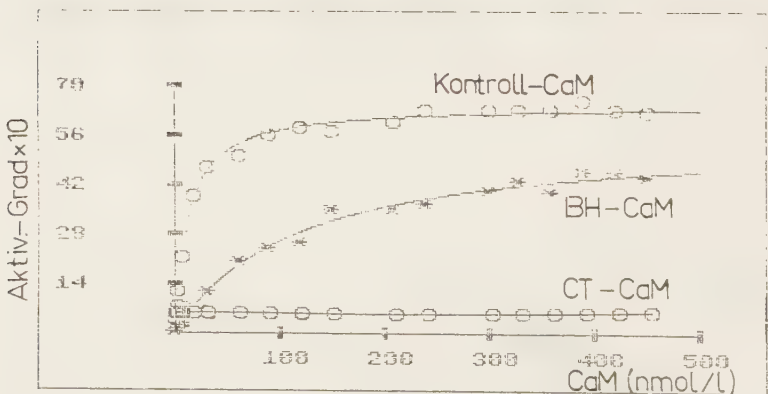


Abb.11: Aktivierung von Phosphorylase Kinase mit verschiedenen modifizierten Calmodulinen bei pH 6,8 in Gegenwart von Ca^{2+} . Die Grundaktivität der Phos Kin bezeichnet man mit A_1 (HEILMEYER & KILIMANN, 1982), die erreichte Aktivität mit A . Der Aktivierungsgrad $AG = (A - A_1) / A_1$. Die Konzentration der Phos Kin betrug: $1,25 \mu\text{g/ml}$, die spezifische pH 6,8-Aktivität des Enzyms war $5,0 \text{ nKat/mg}$ (285 U/mg).

Die Kinase-Aktivierungskurven zeigen, daß eine Aktivierung der Phosphorylase Kinase mit Chloramin T-modifiziertem Calmodulin nicht möglich ist. Ferner, daß das nach Bolton und Hunter modifizierte Calmodulin sehr wohl in der Lage ist, eine Aktivierung dieser Kinase herbeizuführen, wenn auch mit deutlich geringerer Affinität zum Enzym als das Kontroll-Calmodulin.

Der durch nichtlineare Anpassung errechnete K_M -Wert (siehe 2.6.5) beträgt für das native Calmodulin $12,6 \pm 0,8$ nmol/l, für das BH-CaM $116,0 \pm 11,8$ nmol/l. Der Aktivierungsgrad liegt in beiden Fällen bei 5-6.

Nach den Aktivierungsaussagen zu urteilen, kommt das BH-Derivat dem natürlichen Calmodulin wohl am nächsten, während das CT-CaM sicherlich die biologische Aktivität verloren hat (siehe Diskussion, 4.1).

3.1.2.2 Selektion des Iodcalmodulins

Nach den in Kapitel 3.1.1 erhobenen idealen Forderungen an ein iodiertes Calmodulin, zusammen mit den oben beschriebenen Nativitätstests, stellt sich das Problem, einen sinnvollen Kompromiß zwischen praktischer Durchführbarkeit und Nativität des zu benutzenden Derivates zu finden.

Zur Poolgrößenbetrachtung stand die Wechselwirkung des verwendeten Iodcalmodulinderivates mit den Oberflächen der zur Präparation des Calmodulins eingesetzten Gele im Vordergrund. Eine weitgehende Nativität des Modulatorproteins wäre wünschenswert. Sie ist jedoch, wie oben gezeigt, für CT-CaM nicht realisierbar. Da sich dieses Derivat jedoch sowohl in Kombination mit FP-Sepharose als auch mit DEAE-Cellulose verhält wie das natürliche Calmodulin, kommt nur CT-CaM als Tracer für die Poolbestimmungen in Frage.

3.1.3 Bestimmung der gesamten Calmodulin-Menge im Skelettmuskel

3.1.3.1 Isolierung von Calmodulin aus Muskelhomogenat

Zunächst wurde die gesamte Calmodulinmenge aus dem Muskelhomogenat bestimmt. Hierzu diente, wie im Methodenteil beschrieben, die Technik der Isotopenverdünnung mit einer bestimmten Menge (m_{CT-CaM} in mg CT-CaM/kg) eines nach der Chloramin T - Methode iodierten Skelettmuskel-calmodulins mit einer definierten spezifischen Radioaktivität (SR, in CPM/mg). Dann wurde der Muskel mit radioaktivem CT-CaM und Homogenisierungspuffer homogenisiert, und nach 30 min Rühren zur Äquilibrierung, alles Calmodulin durch Kochen freigesetzt. Der nach Zentrifugation erhaltene Kochüberstand diente als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden, kritischen Chromatographieschritte.

a) Ca^{2+} -abhängige Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose):

Der Kochüberstand wurde auf 1 mM Ca^{2+} eingestellt und auf FP-Sepharose, wie in 2.1.5 beschrieben, chromatographiert. In Abb.12 sind die FP-Elutionsprofile gezeigt. Der asymmetrische Peakverlauf (Tail-ling) ist für die Calcium-abhängige Affinitätschromatographie von CaM an diesem Gelmaterial charakteristisch (siehe Abb. 12 A & B). Der Peakbereich wurde durch SDS-Gele analysiert. Dabei zeigte sich, daß das Calmodulin über einen weiten Bereich hinweg von der Säule eluiert wird. An Hand des Radioaktivitätsprofils kann man erkennen, daß während der präparativen Arbeiten, trotz der Vorversuche im analytischen Maßstab (s. Tab. 1), das nicht markierte Calmodulin über einen größeren Bereich eluiert wird als das CT-CaM. Daher würde man eine falsche spezifische Radioaktivität erhalten, wenn nur nach dem Gipfel der Radioaktivität gepoolt würde. Dies erklärt den weiten Bereich, über den die Fraktionen vereinigt wurden (siehe Abb. 12 A,B,C; Pfeil 1 bis 2).

b) Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose:

Der FP-Pool (siehe 2.1.5) wurde eingeeengt und in DEAE-Äquilibrie-

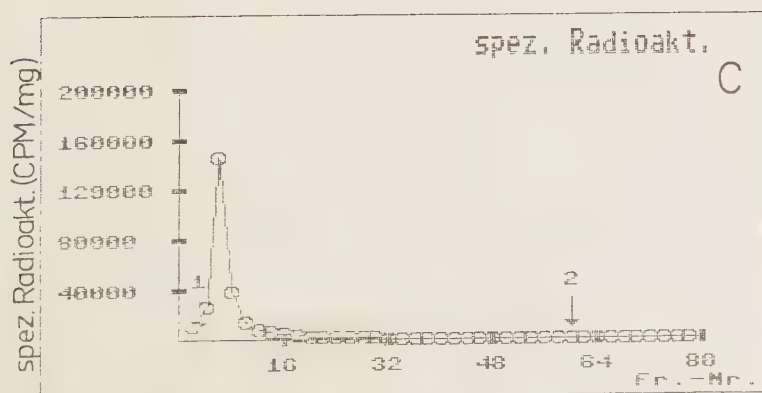
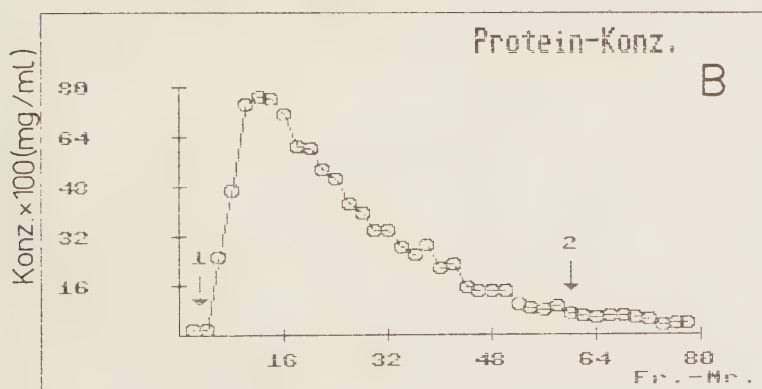
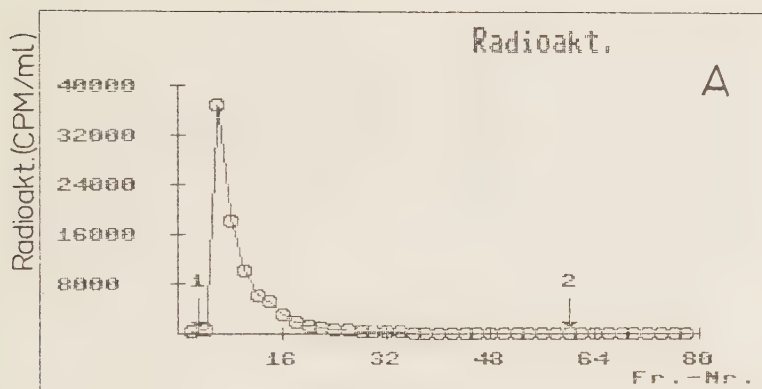


Abb.12

Abb.12: Präparative, Ca^{2+} -abhängigen Affinitätschromatographie von Calmodulin aus Muskelhomogenat an FP-Sepharose (Es wird nur die Elution gezeigt, näheres siehe Tab.2) Es wurde ein radiiodiertes CT-CaM zum Homogenisierungspuffer zugesetzt, das Homogenat gemäß der im Methodenteil angegebenen Vorschrift (2.1.5) zum Kochüberstand weiter verarbeitet und in Gegenwart von 1 mM Ca^{2+} an FP-Sepharose adsorbiert, dann mit Puffer A gespült, mit Puffer B (enthält NaCl und Calcium) gewaschen und schließlich mit Puffer C, Calcium-frei eluiert.

Abbildung A gibt den Verlauf der ^{125}I -Radioaktivität wieder, Abb. B zeigt das zugehörige Proteinkonzentrationsprofil, und Abb. C stellt den Verlauf der spezifischen Radioaktivität dar.

Pfeil 1 gibt den Anfang, Pfeil 2 das Ende der zusammengefaßten Fraktionen an.

(Chromatographiedaten: Flußrate: 85 ml/h, Fraktionsvolumen: 7,5 ml, Säulendurchmesser: 5 cm, Gelbetthöhe: 2 cm).

Weitere Details, siehe 2.1.5.

rungspuffer auf die DEAE-Cellulose-Säule aufgepumpt und mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Die Chromatogramme der Ionenaustauschchromatographie sind in Abb.13 gezeigt. Hier fällt zunächst der symmetrische Radioaktivitätspeak (Abb. 13 A) auf. Das Proteinprofil (Abb. 13 B) zeigt zwei Gipfel, wobei der erste mit dem Maximum der Radioaktivität (Abb. 13 A) und dem der spezifischen Radioaktivität (Abb. 13 C) zusammenfällt. Die für die Totalwertbestimmung des CaM benötigten Fraktionen wurden nach dem Verlauf des Gipfels der spezifischen Radioaktivität zusammengefaßt (Abb. 13 C, Pfeil 1 und 2).

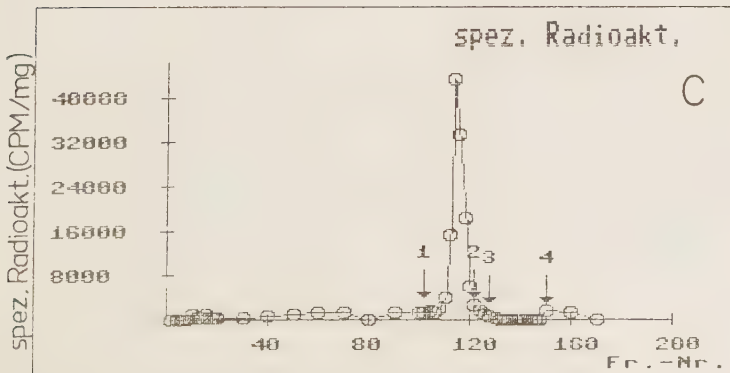
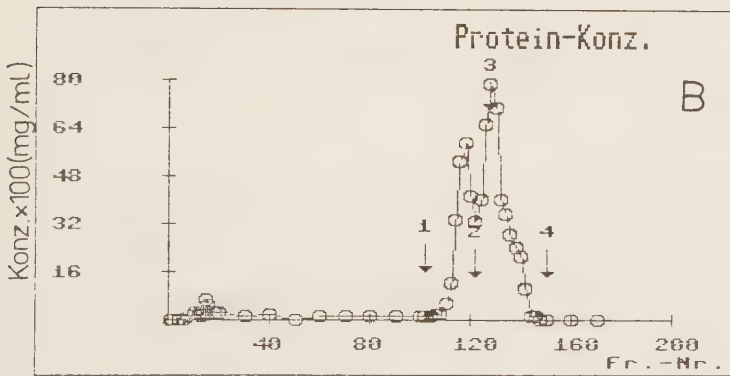
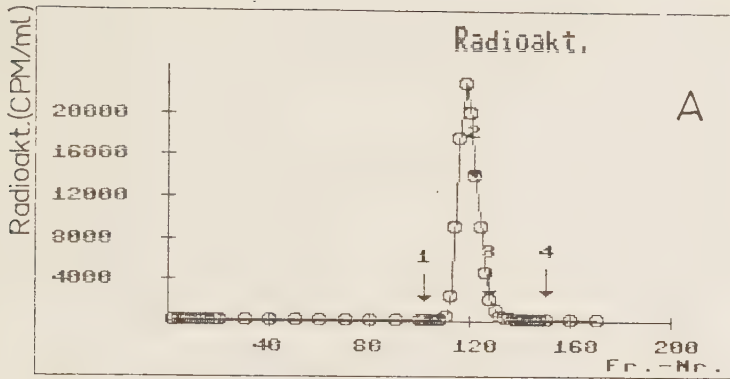


Abb. 13

Abb.13: Ionenaustauschchromatographie von CaM aus Muskel-homogenat an DEAE-Cellulose.

Der FP-Sepharose-Pool wurde eingeengt, gegen Puffer D dialysiert und dann chromatographiert. Die Säule wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 100 mM bis 500 mM während 24h eluiert (Puffer E).

Abbildung A zeigt das Radioaktivitätsprofil des Säulenlaufs, wobei der symmetrische Peak auffällt. Das mittlere Bild (B) zeigt den komplexeren Verlauf der Proteinkonzentration. Das Maximum des ersten, kleineren Peaks fällt mit dem Radioaktivitätsmaximum der oberen Abbildung (A) zusammen.

In der unteren Darstellung (C) sind die spezifischen Radioaktivitäten gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Hier fällt auf, daß dieser Peak mit den Maxima des Radioaktivitätsprofils (A) und dem ersten Maximum des Proteinprofils (B) koinzidiert.

Die Pfeile 1 und 2 schließen die Fraktionen des elektrophoretisch reinen CaM-Pools (Pool 1) ein. Die Pfeile 3 und 4 bilden einen weiteren elektrophoretisch reinen Proteinpool, vermutlich Troponin C. Zwischen beiden Pools liegen noch zwei andere, hinsichtlich der Proteinmenge erheblich kleinere, gemischte Pools (siehe Gel in Abb.14 und Reinigungstabelle (Tab. 2)).

(Chromatographiedaten: Flußrate: 100 ml/h, Fraktionsvolumen: 7 ml, Querschnitt: 2,5 cm, Gelbetthöhe 8 cm). Weitere Einzelheiten, siehe 2.1.5.

Das SDS-Gel unter $\pm$ -Ca²⁺-Bedingungen nach WILLIAMS et al., 1984 (Abb.14) von den verschiedenen Peakregionen der DEAE-Cellulosechromatographie (siehe Abb.13 B) zeigt, daß es sich bei dem ersten Gipfel um Calmodulin handelt. In dem gezeigten Gel kann man gut den durch die Calcium-abhängige elektrophoretische Mobilität bedingten "Sprung" erkennen. Dieses Calmodulin wird jedoch mit fortschreitendem Elutionsvolumen immer stärker mit zwei anderen Calcium-bindenden Proteinen kontaminiert. Bei dem einen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Troponin C. Dies folgt aus dem deutlich kleineren "Calcium-Sprung" und aus der etwas langsameren Migration in dem genannten Gelsystem. Das andere ist ein nicht näher charakterisiertes Protein, welches im SDS-Gel oberhalb von Troponin C läuft. Der letzte Proteinpool (das zweite Proteinmaximum, vergleiche Abb.13 B) ist elektrophoretisch homogen und wird im Folgenden als TNC (Troponin C) bezeichnet. Die Pfeile 1 und 2 in Abb.13 A-C begrenzen den reinen Calmodulinpool, die Pfeile 3 und 4 schließen den reinen TNC-Pool ein.

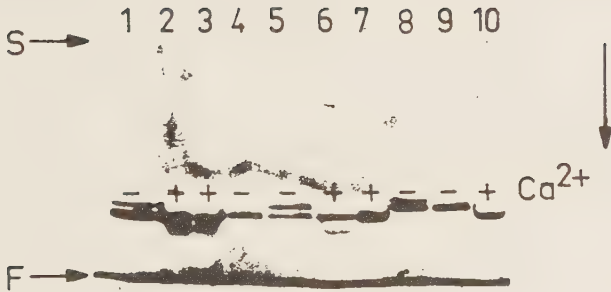


Abb.14: Calmodulin-Identifizierung im DEAE-Säulenlauf zur CaM-Gesamtwertbestimmung aus Muskelhomogenat mit einem 15% SDS-Gel nach WILLIAMS et al. (1984). Bei diesem modifizierten Verfahren wird eine Probe abwechselnd in einer Spur mit Lämmli-Probenpuffer, der zusätzlich noch 10 mM EGTA enthält, mit einer Spur, die Lämmli-Probenpuffer + 1 mM Ca^{2+} enthält, aufgetragen, und die Elektrophorese gestartet. Calcium-bindende Proteine zeigen dann nach Coomassie-Färbung einen mehr oder weniger großen "Sprung" als Folge der Calcium-abhängig veränderten elektrophoretischen Mobilität.

Die Auftragsmenge/Schacht liegt zwischen 5 und 8 μg Protein. Die Spuren 1 und 2 enthalten ein Testgemisch von je 5 μg CaM und TNC. In Spur 1 ist gut erkennbar, daß TNC in Abwesenheit von Calciumionen oberhalb von CaM läuft. Die Spuren 3 und 4 (Fehlen der TNC-Banden) enthalten den eingeeengten DEAE-Pool 1, also reines CaM. In den Schächten 5 und 6 wurde der Pool 2 aufgetragen, offenbar ein Gemisch von CaM, TNC und einem nicht identifizierten, noch über TNC erscheinendem Protein (nur schwach erkennbar, siehe Spur 8). Die Spuren 7 und 8 zeigen ein Gemisch von TNC und dem unbekannten Protein. Die Spuren 9 und 10 zeigen ein elektrophoretisch reines Protein, mit deutlich kleinerem "Sprung" als CaM. Hierbei handelt es sich wohl um TNC. S gibt den Beginn des Trenngels an, F die Front. Der vertikale Pfeil zeigt die Laufrichtung des Elektrophoresesgels an.

In Tab. 2 ist die Reinigungstabelle für die Präparation des Gesamtcalmodulins aus Kaninchenskelettmuskel-Homogenat abgebildet. Hier erkennt man, daß nur etwa 1/3 der eingesetzten Radioaktivität aus dem Homogenat in den Kochüberstand gelangt. Es handelt sich hierbei um eine Folge der hohen Viskosität des Muskelbreis. Dieses Reinigungsschema zeigt weiterhin, daß das isolierte Calmodulin während der Präparation insgesamt etwa 1500fach angereichert wird. Die Gesamtausbeute liegt typischerweise um 20%, jedoch beträgt die auf den Kochüberstand bezogene Radioaktivitätsausbeute ca 63%.

Schritt	Volumen ml	RADIOAKTIVITÄT				PROTEIN		
		Konz. CPM/ml	Summe CPM	SR CPM/µg	Ges.-Ausbeute %	Anreicherung	Konz. µg/ml	Summe µg
Homogenat	6 500,0	785	5,10x10 ⁶	28	100,0	1	27,70	180 000,0
<u>Hitzeschritt:</u>								
Kochüberstand	4 000,0	370	1,50x10 ⁶	218	29,4	8	1,70	6 800,0
<u>FP-Chromatographie:</u>								
FP-Durchlauf	4 800,0	0	0	0	/	/	1,10	5 280,0
FP-NaCl-Wasch	1 500,0	0	0	0	/	/	0,47	705,0
FP-Pool	22,5	57 900	1,30x10 ⁶	12 113	25,8	433	4,78	102,0
<u>DEAE-Chromatographie:</u>								
Pool1=CaM	4,8	197 830	949 584	43 768	18,8	1 563	4,52	21,70
Pool2	3,2	15 910	50 912	6 049	1,0	/	2,63	8,4
Pool3	3,4	2 070	7 038	1 083	0,1	/	1,90	6,5

Tab. 2: Reinigungstabelle der Präparation von Calmodulin aus Skelettmuskelhomogenat. SR = spezifische Radioaktivität. Alle CPM-Angaben beziehen sich auf ¹²⁵I. CT-CaM (1,7x10⁶ CPM/mg, 0,03 mg/kg Muskel) diente als Tracer (weitere Details in Kapitel 2.3). Der DEAE-Pool 1 enthält reines CaM, Pool 2 und Pool 3 sind Gemische aus CaM, Troponin C (TNC) und einem unbekannten höhermolekularen Protein, Pool 4 ist elektrophoretisch rein und ist höchstwahrscheinlich TNC. Siehe auch SDS-Gel in Abb.14. Die Calmodulinausbeute liegt typischerweise um 20%.

3.1.3.2 Ergebnis der Calmodulin-Poolgrößenbestimmung aus Homogenat

Die Gesamtpoolgröße P_{gesamt} in mg CaM/kg Muskel ergibt sich zu (vergleiche Abb.3 in 2.3):

$$P_{\text{gesamt}} = Q \times m_{\text{CT-CaM}} \quad (1)$$

Das Verhältnis $Q = SR_1/SR_H$ stellt denjenigen Faktor dar, um den das, zu Beginn im Puffer zugesetzte, ^{125}I -Calmodulin mit unmarkiertem, aus dem Muskel isoliertem Calmodulin, verdünnt wird.

SR_H ist die spezifische Radioaktivität in Calmodulin, das aus Homogenat isoliert wurde.

SR_1 gibt die spezifische Radioaktivität des CT-CaM an.

Drei verschiedene Experimente wurden mit Hilfe von Gleichung (1) ausgewertet. Die berechneten Gesamtpoolgrößen aus Homogenat sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

VERSUCH	EINGESETZTES ^{125}I -CaM	CaM AUS HOMOGENAT	
	SR_1 CPM/mg	$m_{\text{CT-CaM}}$ mg/kg	SR_H Poolgröße CPM/mg mg/kg Muskel
1	$13,5 \times 10^7$	0,03	34 328 118
2	$17,0 \times 10^7$	0,03	43 768 117
3	$5,4 \times 10^7$	0,03	16 669 97

Tab. 3: Bestimmung der Gesamtpoolgröße von Calmodulin im Kaninchenskelettmuskel.

SR_1 : spezifische Radioaktivität des eingesetzten Tracers.

$m_{\text{CT-CaM}}$: Masse des eingesetzten Tracer-CaM.

SR_H : spezifische Radioaktivität von CaM aus Homogenat.

Wie an Hand der Tabelle ersichtlich ist, ergaben die Poolbestimmungen, daß die Gesamtpoolgröße des Calmodulins im Skelettmuskel des Kaninchens ca 100-120 mg/kg beträgt. Diese Menge liegt mehr als 2fach über den bisher geschätzten Werten (SHENOLIKAR et al., 1979; COHEN, 1980).

3.1.4. In vitro - Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools

Erste Hinweise auf einen bestehenden integralen Calmodulin-Pool ergaben sich bereits 1978 (COHEN et al., 1978; SHENOLIKAR et al., 1979), als die Arbeitsgruppe von Cohen zeigte, daß die Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase identisch mit Calmodulin ist. Ferner war die Existenz eines freien Calmodulins in der Muskelzelle bekannt. Daher wurde zuerst nach einer Möglichkeit gesucht, diese beiden Calmodulin-Pools voneinander zu trennen. Im ersten Ansatz wurden präparationsbedingte Trennschritte zugrunde gelegt. Zunächst wurde aus zerkleinertem Skelettmuskel, der wie im Methodenteil und zuvor beschrieben, mit ^{125}I -CT-CaM-haltigem Homogenisierungspuffer, Calcium-frei extrahiert wurde, die Phosphorylase Kinase isoliert. Hierzu wurde das von JENNISSEN et al. (1975) und COHEN (1973) angegebene Verfahren durch Zusatz von EGTA im Extraktionspuffer (freie Calciumionenkonzentration ca. 10 nM, d.h. bei dieser Konzentration bindet CaM keine Ca^{2+} -Ionen), modifiziert. Hierbei findet im ersten Schritt eine grobe Trennung in Calcium-frei extrahierbare und in nicht extrahierbare Proteine statt. Diese Grobseparation erfolgt durch Zentrifugation. Dieser Sedimentationsüberstand ist der sogenannte Ronextrakt; das Sediment besteht im wesentlichen aus Myofibrillen. Aus dem Rohextrakt wurden Phosphorylase Kinase und freies Calmodulin isoliert (siehe 2.1.3 & 2.1.6).

Bei der Isolierung dieser Kinase stellte sich in Vorversuchen ohne EGTA heraus, daß nur etwa 40% der eingesetzten Radioaktivität im Rohextrakt erscheinen, während apparent mehr als die Hälfte (55,6%) im Myofibrillenpellet erscheint (siehe Tab.4). Daraus ergab sich dann zwangsläufig, später aus dieser Fraktion eine Calmodulin-Präparation zu versuchen. Andererseits wird hier ein Separationsproblem deutlich: Die Phosphorylase Kinase wird vom freien Calmodulin durch eine Säure-

RADIOAKTIVITÄT

ENZYMAKTIVITÄT

Schritt	Volumen	Konz.	Summe	SR	Ges.-Ausbeute	Konz.	Summe	SA	Ges.-Ausbeute	Anrei-
	ml	CPM/ml	CPM	CPM/μg	%	nkat/ml	nkat	nkat/μg	%	cherung
<u>Zentrif.:</u>										
Roheextr.	4 950	541	2,68x10 ⁶	28	44,4	21,0	103 950	1	100,0	1
Myo-Pellet*	2 000	1 680	3,36x10 ⁶	/	55,6	/	/	/	/	/
<u>Säuref.:</u>										
Säure-S	5 000	493	2,46x10 ⁶	28	40,7	0,9	4 500	0	4,3	/
Pott.-Hom.	330	445	146 850	31	2,4	255,0	84 150	17	81,0	17
(Säure-P)										
<u>Ultras.:</u>										
30-S	275	210	57 750	53	1,0	229,0	62 975	29	60,6	29
30-P	55	615	33 825	9	0,6	341,0	18 755	5	18,0	/
<u>Seifil.:</u>										
4B-Pool	495	28	13 613	/	0,2	83,0	41 085	/	39,5	/
<u>DEAE-Cel.:</u>										
PhosKin	25	60	1 500	8	3x10 ⁻²	1045,0	26 125	147	25,1	147

Tab. 4: Reinigungstabelle der Phosphorylase Kinase (Vorversuch mit Hauskaninchen, Extraktion ohne EGTA, aus 2 kg Muskel).

SR = spezifische Radioaktivität. Alle CPM-Angaben beziehen sich auf ¹²⁵I.

SA = spezifische katalytische Aktivität der Phos Kin, alle Enzymaktivitäten sind bei pH 8,2 gemessen.

CT-CaM = nach der Chloramin T-Methode iodiertes CaM (SR=6,0x10⁷ CPM/mg, m=0,03 mg, Radioakt.-Menge=6,06x10⁶ CPM = 100%-Wert für die Bestimmung der Radioakt.-Gesamtausbeute).

S = Sedimentationsüberstand, P = Pellet, 30-S = Überstand der Ultrazentrifug. im Ti-45 Rotor, 30 000 UPM (75 000 g), 30-P analoges Pellet.

4B = Sepharose 4B, PhosKin = eingeeingter, erster, auf DEAE-Cellulose (DEAE-Cel.) erhaltener Pool.

*Die Proben des Myofibrillen-Pellets wurden im Gegensatz zu den anderen Proben nicht TCA-gefällt, weil das Fibrillen-Material in 0,1M NaOH/1%SDS gelöst war.

fällung getrennt. Wie man in Tab.4 erkennt, verbleibt jedoch etwa 4 % Kinase im Säureüberstand. Da aber aus diesem Überstand das freie Calmodulin isoliert werden soll, muß zuvor sichergestellt sein, daß keine Phosphorylase Kinase und damit kein gebundenes Delta als Poolverunreinigendes Modulatorprotein in den freien Pool mit eingebracht wird. Der erste Calmodulin-Reinigungsschritt ist die Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose. Deshalb mußte überprüft werden, ob bei dieser Anreicherungstechnik Kinase an das Affinitätsgel adsorbiert wird, und wenn, ob diese im Calcium-freien Eluat wieder auftaucht. Hierzu wurde unter den für die FP-Chromatographie üblichen Bedingungen Phosphorylase Kinase Calcium-abhängig an die Gelmatrix gebunden, und diese dann nach dem Waschen mit EGTA eluiert. Das Chromatogramm dieses Experimentes ist in der nächsten Abbildung (Abb.15) gezeigt. An Hand des Proteinprofiles dieses Affinitätslaufes erkennt man, daß unter den Calcium-freien Elutionsbedingungen für Calmodulin mit EGTA keine signifikante Menge Protein und damit Calmodulin die Säule verläßt, sondern praktisch die gesamte Proteinmenge (93,1%) erst mit NaOH/SDS eluiert wird. Die aufgetragene Menge Phosphorylase Kinase betrug 2,3 mg. 1/20 dieser Masse war die maximale Delta-Menge, also 0,115 mg, die man bei Calcium-freier Elution erwarten würde. Im EGTA-Pool finden sich jedoch weniger als 0,02 mg Nicht-Delta-Protein nach SDS-Gelanalyse des EGTA-Eluates (nach Ankonzentrieren mit TCA). Dieses Resultat bedeutet, daß die Separation der Phosphorylase Kinase und freiem Calmodulin unter den angegebenen Bedingungen praktisch quantitativ verläuft.

Aus der Kinase-Reinigungstabelle (Tab.4) kann man ferner sehen, daß die Delta-Einheit dieses Enzyms praktisch nicht mit dem zugesetzten Tracer austauscht. (Spezifische ^{125}I -Radioaktivität = 8 CPM/mg, dh. der Meßwert liegt knapp über der Nachweisbarkeitsgrenze). Daher kann die im vorigen Abschnitt angegebene Gleichung (1) nicht zur Poolgrößenberechnung für Delta herangezogen werden (siehe 2.3.1), sondern Delta muß an Hand der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase abgeschätzt werden. Hieraus ergibt sich dann ein Wert von ca 25 mg Delta/kg Muskel (Aus der Annahme, daß die PhosKin im Rohextrakt dieselbe spezifi-

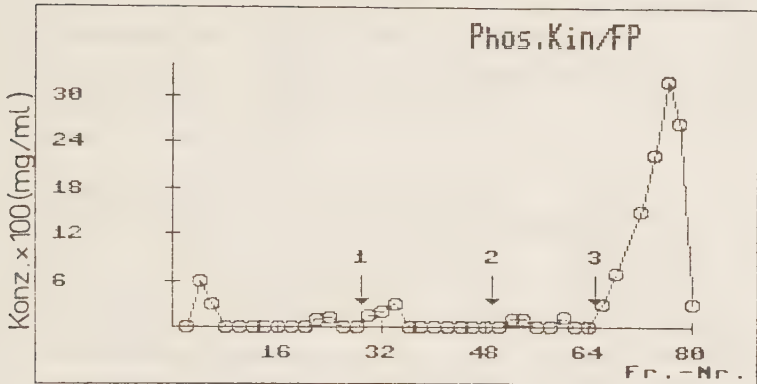


Abb.15: Chromatographie von Phosphorylase Kinase an Fluphenazin-Sephadex.

Pfeil 1: Puffer B (Calcium-haltig)

Pfeil 2: Puffer C (Calcium-frei)

Pfeil 3: 0,1 M NaOH/1% SDS

Aufgetragen wurden 2,30 mg PhosKin (0,575 mg/ml Gel), wiedergefunden im NaOH/SDS-Peak: 2,14 mg (93,1%). Alle gemessenen Proben, mit Ausnahme der SDS-haltigen Fraktionen wurden TCA-gefällt.

(Säulendaten: Höhe=5,1 cm, Durchmesser=1 cm, Flußrate: 10 ml/h, Fraktionsvolumen 0,5 ml).

sche Enzymaktivität wie das Endprodukt aufweist folgt, daß der Rohextrakt 354 mg Kinase/kg Muskel, entsprechend 18 mg Delta/kg Muskel enthält. Im Myofibrillenpellet liegt die Kinase wahrscheinlich in gleicher Konzentration wie im Rohextrakt vor, d.h. es werden ca 143 mg Kinase, entsprechend 7 mg Delta nicht extrahiert. Demnach existieren ca. 25 mg Delta/kg Muskel).

Dieser Wert steht im Einklang mit dem von anderen gefundenen (SHENOLIKAR et al., 1979; PETERSEN-VON GEHR, 1981).

Weiterhin ist an der extrem niedrigen spezifischen Radioaktivität der gereinigten Phosphorylase Kinase zu ersehen, daß keine signifikante Menge Delta' mit in den Delta-Pool "verschleppt" wird.

3.1.4.1 Isolierung von Calmodulin aus Säureüberstand und Myofibrillen

Aus dem Überstand der Säurepräzipitation der Phosphorylase Kinase wurde, wie im Methodenteil und im Kapitel über die Gesamtpoolgröße beschrieben, ebenfalls eine Calmodulinpräparation durchgeführt. Dabei fanden wieder die Calcium-abhängige Affinitätschromatographie an FP-Sepharose (Abb.16) sowie die Nachreinigung auf DEAE-Cellulose (Abb.17) Verwendung.

Während der Präparation aus dem Überstand der Kinasefällung mußte auf strikten Proteolyseschutz (PMSF, Leupeptin und Temperaturen unter 4°C) geachtet werden. Bei der Isolierung des Calmodulins aus den Myofibrillen mußte man streng auf eine sorgfältige Abtrennung des teilweise mit angereicherten TNC achten. Allerdings war dieses Problem hier von weitaus geringerer Bedeutung als im Falle der Gesamtwertbestimmung. Die Säulenläufe der beiden Calmoduline auf den beiden Gelen sind in Abb.16-Abb.19 gezeigt. Die Fluphenazin-Läufe (Abb.16 & 18) zeigen wieder die typische Schwanzbildung nach hinten. Hierbei ist beim Calmodulin aus Myofibrillen eine leichte Schulterbildung (Abb.18 B) ersichtlich, wohl als Zeichen des mit angereicherten TNC. Kriterium für das Zusammenfassen der einzelnen Fraktionen zum FP-Pool waren zum einen die SDS-Gele, zum anderen das Absinken der Radioiodaktivität auf unter 5% des Radioaktivitätsmaximums.

Im DEAE-Cellulose Chromatogramm des freien Calmodulins (Abb.17) fällt wieder die Symmetrie des eluierten Gipfels auf, sowohl im Radioaktivitäts- (Abb. 17 A) als auch im Proteinverlauf (Abb.17 B). Im Konzentrationsprofil ist ein Durchlaufpeak erkennbar. Dieser fehlt im Radio-

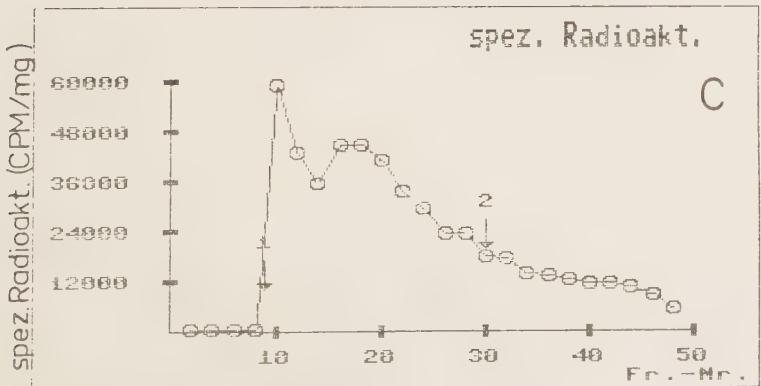
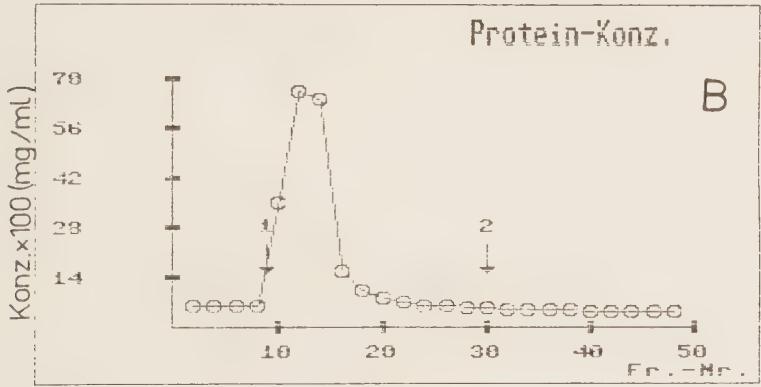
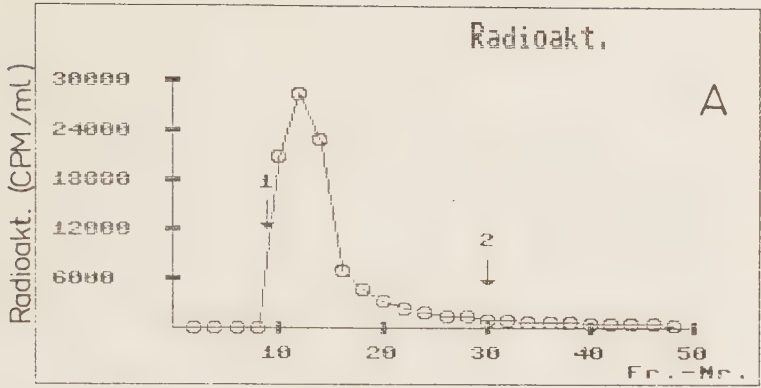


Abb. 16

Abb.16:Fluphenazin-Chromatographie von freiem Calmodulin aus dem Überstand der Säurefällung von Phos Kin. Gezeigt ist lediglich das Elutionsprofil mit dem Calcium-Chelator EGTA.

Die obere Abbildung (A) gibt den Verlauf der ^{125}I -Radioaktivität wieder, Darstellung B zeigt das entsprechende Profil der Proteinkonzentrationen. Die untere Grafik (C) gibt den Verlauf der spezifischen ^{125}I -Radioaktivität wieder.

Alle gemessenen Fraktionen wurden TCA-gefällt.

Pfeil 1 gibt den Beginn der für den FP-Pool zusammengefaßten Fraktionen an, Pfeil 2 das Ende.

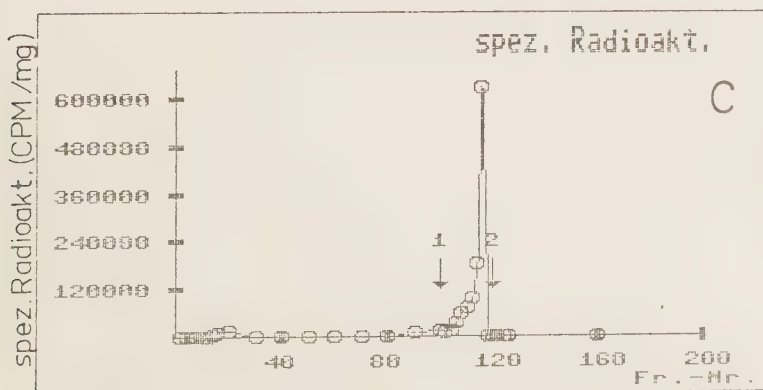
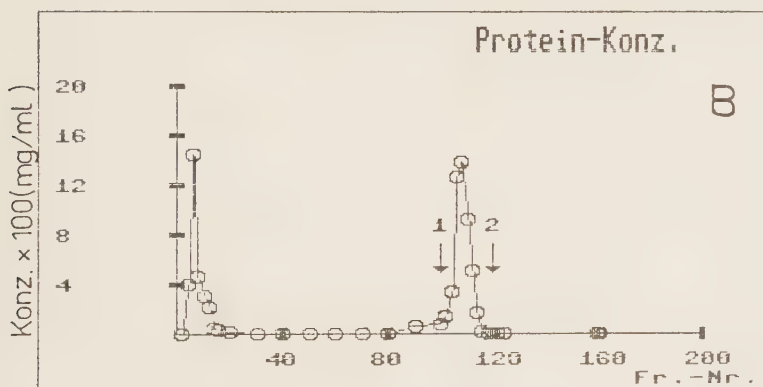
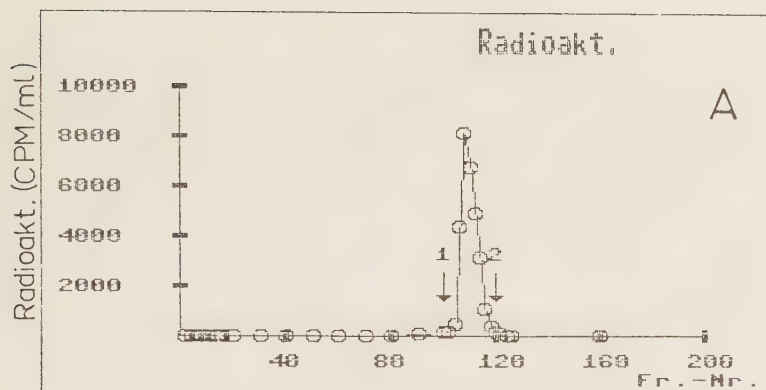


Abb. 17

Abb.17:DEAE-Cellulose-Chromatographie des freien CaM aus dem Säureüberstand der Kinase. Aufgetragen wurde der eingengte FP-Pool aus Abb.16. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 100 mM (Puffer D) bis 500 mM (Puffer E) in Gegenwart von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Das obere Diagramm (A) zeigt den Verlauf der TCA-fällbaren ^{125}I -Radioaktivität, das mittlere (B) gibt das Proteinprofil wieder. Der Durchlaufpeak enthält keine Radioaktivität; er besteht aus mehreren relativ zum CaM höher- und niedermolekularen, nicht näher charakterisierten Proteinen. Er enthielt jedoch niemals Calmodulin.

In der unteren Darstellung (C) ist der Verlauf der spezifischen ^{125}I -Radioaktivität gezeigt.

Pfeil 1: Anfang des reinen CaM-DEAE-Pools

Pfeil 2: Ende des reinen CaM-DEAE-Pools

(Chromatographiedaten: Höhe der Säule: 8 cm, Durchmesser: 2,5 cm, Flußrate: 100 ml/h, Fraktionsvolumen: 5,5 ml). Weitere Details siehe 2.1.5 & 2.1.6.

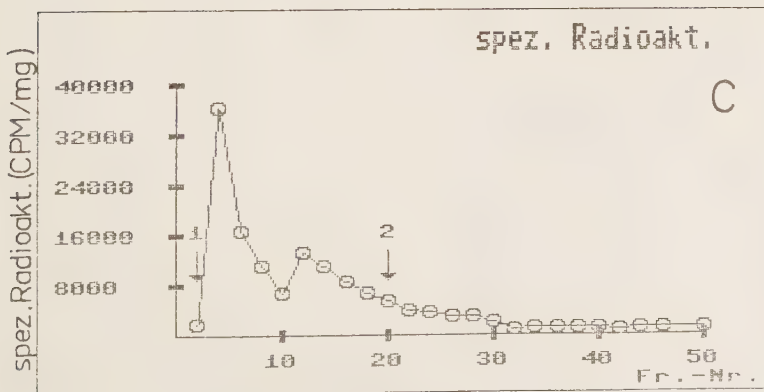
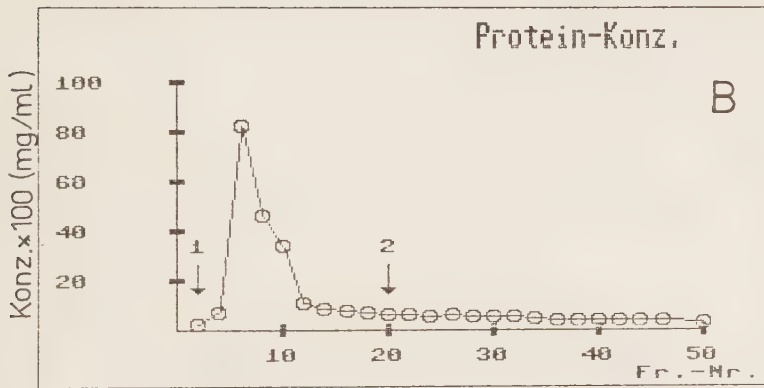
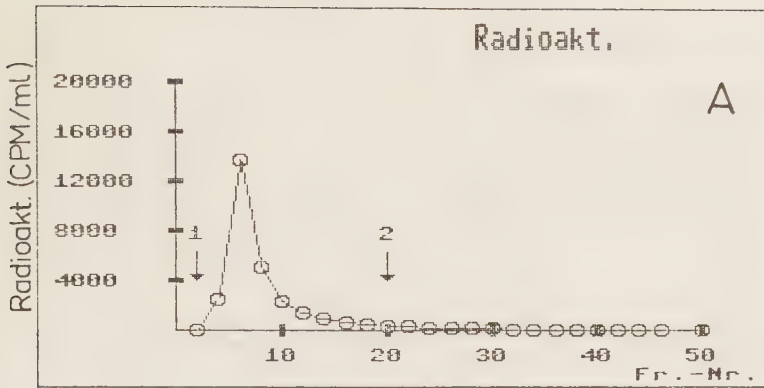


Abb. 18

Abb.18: Fluphenazin-Chromatographie von Calmodulin aus Myofibrillen.

Gezeigt ist, ebenso wie in Abb.16, lediglich das Elutionsprofil mit dem Calcium-Chelator EGTA.

Die obere Abbildung (A) gibt den Verlauf der ^{125}I -Radioaktivität wieder, die mittlere (B) zeigt das entsprechende Profil der Proteinkonzentrationen. Das untere Diagramm (C) stellt den Verlauf der spezifischen ^{125}I -Radioaktivität dar.

Alle gemessenen Fraktionen wurden TCA-gefällt.

Pfeil 1 gibt den Beginn der für den FP-Pool zusammengefaßten Fraktionen an, Pfeil 2 das Ende. Kriterium für das Ende des Pools war das Absinken der Radioaktivität auf unter 5% des Maximums der Radioaktivität, sowie die SDS-Gele der einzelnen Fraktionen.

(Chromatographiedaten: Säulendurchmesser: 5 cm, Gelbett-höhe: 2 cm, Fraktionsvolumen 7,5 ml, Fluß: 85 ml/h).

Für weitere Informationen siehe 2.1.7.

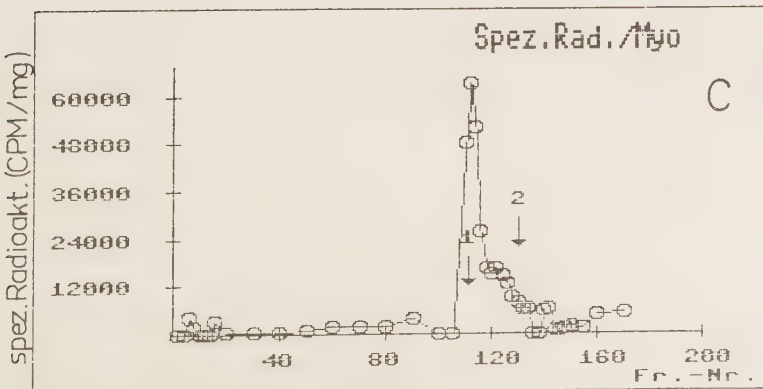
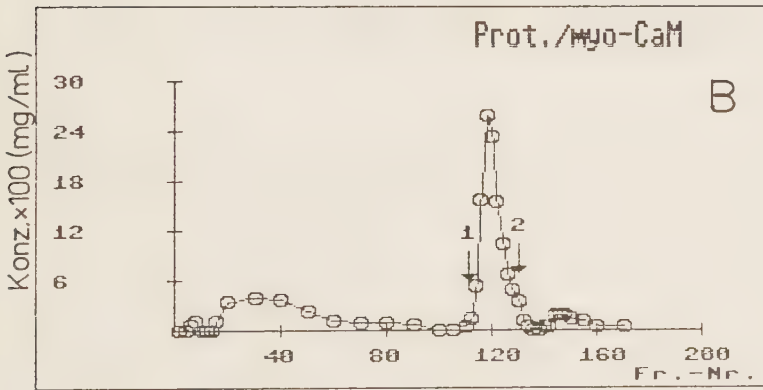
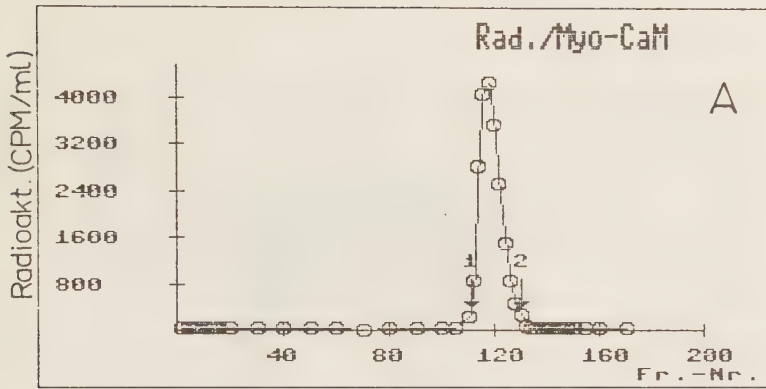


Abb. 19

Abb.19:DEAE-Cellulose-Chromatographie des myofibrillären CaM. Aufgetragen wurde der eingeeengte FP-Pool aus Abb.18. Die Elution geschah durch einen linearen NaCl-Gradienten von 100 mM (Puffer D) bis 500 mM (Puffer E) in Gegenwart von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Das obere Diagramm (A) zeigt den Verlauf der TCA-fällbaren ^{125}I -Radioaktivität, das mittlere (B) gibt das Proteinprofil wieder. Auf dem unteren (C) Bild ist der Verlauf der spezifischen Radioaktivität dargestellt.

Pfeil 1: Anfang des reinen CaM-DEAE-Pools

Pfeil 2: Ende des CaM-Pools

Im Proteinprofil (B) ist ein kleiner Durchlaufpeak zu erkennen und hinter dem Hauptgipfel ein kleinerer Nachpeak. Dieser Nachgipfel enthält TNC. Dabei überschneidet sich dieses ein wenig mit dem CaM-Peak, was sich in einer Schulter der spezifischen Radioaktivität (C) äußert. Darum kann nicht der komplette Hauptgipfel gepoolt werden.

(Chromatographiedaten: Höhe der Säule: 8 cm, Durchmesser: 2,5 cm, Flußrate: 100 ml/h, Fraktionsvolumen: 5,5 ml). Weitere Details siehe 2.1.5 & 2.1.7.

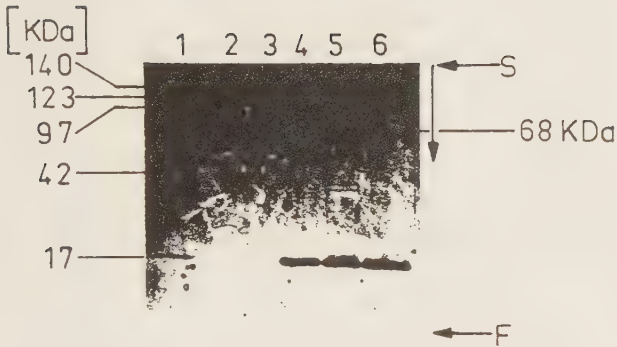


Abb.20: Calmodulin-Endprodukte der Poolbestimmungen. SDS-Gradientgel (8-20%, Coomassie-Färbung), alle Proben wurden in Lämmli-Auftragungspuffer, der auf 10 mM EGTA eingestellt war (siehe 2.6.7.1 & 2.6.7.2), aufgenommen.

- Spur 1: 11 μ g Phosphorylase Kinase, deren heterologe Untereinheiten folgende Molekularmassen (JENNISSEN et al., 1985) aufweisen: alpha: 140 KDa, beta: 123 KDa, gamma: 42 KDa und Delta=CaM: 17 KDa.
- Spur 2: 5 μ g Glykogen Phosphorylase b (97 KDa)
- Spur 3: 5 μ g BSA (68 KDa)
- Spur 4: 5 μ g CaM aus Säureüberstand (vergl. Abb.16 & 17)
- Spur 5: 5 μ g CaM aus Myofibrillen. (vergl. Abb.18 & 19)
Die beiden gelegentlich auftretenden, kontaminierenden Banden zwischen 17 und 42 KDa betragen weniger als 1% der Myo-Calmodulin-Menge.
- Spur 6: 5 μ g CaM aus Kaninchenskelettmuskelhomogenat

Der vertikale Pfeil zeigt in die Laufrichtung des Gels, S bedeutet: Beginn des Trenngels, F gibt die Laufrichtung an.

aktivitätsprofil vollständig. Eine Analyse dieses Gipfels zeigte, daß es sich um nicht näher bestimmte, relativ zum Calmodulin nieder- und höhermolekulare Proteinbanden handelt. Calmodulin konnte in diesem Bereich niemals nachgewiesen werden. Mit dem entsprechenden, jedoch kleineren und breiteren Vorpeak des aus Myofibrillen isolierten Calmodulins verhielt es sich ebenso (vergl. Abb.19 B). Beim Diagramm der spezifischen Radioaktivität (Abb.17 C & 19 C) tritt eine Besonderheit auf: Das spezifische Maximum fällt nicht mit dem Protein- und dem Radioaktivitätsmaximum zusammen, sondern es ist um zwei Fraktionen zum Elutionsbeginn hin verschoben. Dies liegt vermutlich in der Tatsache begründet, daß es unter gewissen Umständen gelingt, mikroskopische Unterschiede von iodiertem und nichtiodiertem Calmodulin sichtbar werden zu lassen. Da aber auch hier die Spitzenfraktionen der spezifischen Radioaktivität mitgepoolt wurden, kann nach wie vor Gleichung (1) zur Berechnung der Poolgröße angewendet werden.

In der Abb.20 ist das SDS-Gel der aufgereinigten Endprodukte Phosphorylase Kinase, Calmodulin aus dem überstand der Kinasefällung und Calmodulin aus Myofibrillen in Abwesenheit von Calcium (siehe 2.6.7.2) aufgetragen, dargestellt.

3.1.4.2 Differenzierung von drei verschiedenen Calmodulin-Pools und Bestimmung der Poolgrößen

Nachdem nun die einzelnen Calmoduline in reiner Form als Gemisch von nativem und ^{125}I -CT-Calmodulin vorlagen, konnte in jedem Calmodulin die spezifische Radioiodaktivität ermittelt werden und die jeweilige Poolgröße nach Gleichung (1) errechnet werden. Die nach diesem Verfahren berechneten Poolgrößen sind in Tab. 5 wiedergegeben:

EINGESETZTES ^{125}I -CaM

ISOLIERTE CALMODULINE

Spez. Radioakt. CPM/mg	Menge mg/kg	Spez. Radioakt. (CPM/mg)			Poolgröße (mg/kg Muskel)			Summe
		Überstand	Myofibrillen	Kinase*	Überstand	Myofibrillen	Kinase*	
$5,4 \times 10^7$	0,03	79 371	16 078		21	103	25	149
$4,9 \times 10^7$	0,03	84 782	21 383		19	76	25	120
$6,0 \times 10^7$	0,05			10				

- * Die integrale Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase tauscht praktisch nicht mit zugesetztem Tracer aus, sodaß eine Poolberechnung aus der spezifischen Radioaktivität nicht erlaubt ist. Die Angabe bezieht sich daher auf die an Hand der Enzymaktivität geschätzte mittlere Menge Calmodulin in Phos Kin.

Tab. 5: Bestimmung der Einzelpools des intrazellulären CaM im Skelettmuskel

In Tab.5 fällt zunächst auf, daß in zwei voneinander unabhängigen Präparationen die spezifische ^{125}I -Radioaktivität desjenigen Calmodulins, welches aus dem Überstand der Kinasefällung isoliert wurde, um das vier- bis fünffache über der spezifischen Radioaktivität des aus Myofibrillen gereinigten Calmodulins liegt. Bei freiem Austausch des zugesetzten Tracers (CT-CaM) mit den beiden isolierten Calmodulinen, in Abwesenheit von Calciumionen, würde man die gleiche spezifische Radioaktivität erwarten. Da dies bei weitem nicht der Fall ist (Faktor 4-5 Unterschied), kann dies nur bedeuten, daß kein freier Austausch des myofibrillären Calmodulins gewährleistet ist. Das wiederum bedeutet, daß in den Myofibrillen ein neuer, bislang unbekannter, integraler Calmodulin-Pool existieren muß, dessen Austausch mit dem CT-CaM durch einen Hitzeschritt erzwungen werden mußte. Durch diese Hitzebehandlung war dann auch wieder die Gültigkeit von Gleichung (1) (2.3.1) gewährleistet und die Poolgröße konnte, genau wie bei der Gesamtwertbestimmung (3.1.3.2), berechnet werden.

Die Analyse der Einzelpooldaten ergab somit, daß es neben dem freien

löslichen Calmodulinpool zwei weitere, zunächst noch auf den Austausch von zugesetztem ^{125}I -Calmodulin im Muskelhomogenat bezogene, integrale Calmodulinpools gibt: a) einen zusätzlichen Phosphorylase Kinase Pool, der bereits, ebenso wie der freie, vermutet wurde (SHENOLIKAR et al., 1979) und b) einen neu entdeckten myofibrillären Pool. Der Gesamtpool verteilt sich zu ca. 15% auf den freien, zu ca. 19% auf den integralen Pool der Phosphorylase Kinase und zu ca. 67% auf den neuen integralen Myofibrillenpool.

Betrachtet man die Summe der Einzelpools in Tab.5, so findet man eine Gesamtpoolgröße von mittleren 135 mg Calmodulin pro kg Muskel. Vergleicht man diesen Wert mit dem bei der Gesamtpoolbestimmung erhaltenen (100-120 mg/kg Muskel, siehe Kapitel 3.1.3.2), so findet man für die unter schwierigen experimentellen Umständen (hohe Homogenat-Viskosität, Fremdproteinabtrennung, Proteolyse und individuelle Tiereigenschaften) erhaltenen Daten eine exzellente Übereinstimmung, die somit eine zusätzliche Kontrolle darstellt.

3.2. In vivo Turnover-Messungen

3.2.1. Problemstellung und Methodenwahl

Nachdem im letzten Kapitel die Pool-Verhältnisse des Calmodulins klargelegt wurden, können jetzt ergänzende Turnovermessungen durchgeführt werden. Hierbei sollte insbesondere die Frage geklärt werden, ob es bestimmte Synthesepools gibt, die mit den in vitro gefundenen Kompartimenten korreliert sind. Wenn dieser Fall vorliegt, so erwartet man für verschieden kompartimentierte Proteine unterschiedliche Auf- und Abbauraten. Zur Untersuchung dieser Problemstellung bietet sich die Doppelisotopenmarkierung (siehe 2.5.3) an.

Bei der Doppelisotopenmarkierung werden in einem Experiment zwei Punkte der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein erhalten. Die Tiere werden mit einer radioaktiv markierten Aminosäure (in der vorliegenden Arbeit: ^3H -Leucin) einer ersten Pulsmarkierung unterzogen. Nach einer Inkorporationsdauer von 6-21 Tagen erfolgt eine zweite Pulsmarkierung. Es wird wieder die gleiche Aminosäure injiziert, die aber diesmal mit einem anderen Isotop markiert ist (in der vorliegenden Arbeit: ^{14}C -Leucin). Genau 24 h nach dieser zweiten Pulsmarkierung werden die Tiere geschlachtet. Die einzelnen Turnoverexperimente unterscheiden sich demnach nur in der Dauer der ^3H -Leucin Inkorporation (siehe 2.5.2 & 2.5.3).

Während die Einbaurate der zuerst verabreichten Aminosäure ein Maß für die Degradationsgeschwindigkeit der untersuchten Proteine wird, beschreibt der radioaktive Einbau der zweiten Aminosäure die Geschwindigkeit des initialen Einbaus.

Die Anwendbarkeit der Pulsmarkierungs- und der Doppelmarkierungsmethode setzt die Erfüllung folgender Bedingungen voraus (ARIAS et al., 1969):

1. Während der Versuchsdauer darf sich das Körpergewicht der Tiere

nicht ändern. Die Menge des untersuchten Proteins muß konstant bleiben (Steady state).

2. Die markierten Proteine werden genau wie die unmarkierten Proteine synthetisiert und abgebaut.
3. Durch das Verabreichen der markierten Aminosäure dürfen die Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren im Pool nicht verändert werden.
4. Radioaktive Metabolite dürfen nicht in andere Aminosäuren eingebaut werden.
5. Alle Proteine werden aus einem Aminosäurepool synthetisiert.
6. Die Synthese- und Degradationsrate ist für beide applizierten Aminosäuren gleich.
7. Die Proteine werden nach einer Kinetik 1. Ordnung abgebaut.

Die Punkte 2-7 sind für die Pulsdoppelmarkierung mit $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Leucin im Kaninchen hinreichend gesichert (PETERSEN, 1981; ZAK et al., 1979). Daher muß lediglich Punkt 1 als einer der wichtigsten vor jeder Untersuchung in diesem sensiblen System erneut überprüft werden.

Samtliche zu Versuchszwecken benutzten Tiere wurden mit einem Standardfutter zur Kaninchenzucht ad libitum angefüttert bis sie 3 kg Körpermasse erreichten. Ab 3 kg wurde nur noch der Energieerhaltungsbedarf von 1,3 MJ/d (310 kcal/d) (SCHLEY, 1985) verabreicht. Wogen die Versuchstiere mehr als 3 kg bei Lieferung, so erhielten sie sofort den Erhaltungsbedarf.

Verzichtete man auf die kalorische Einschränkung der Tierernährung, so nahmen die Tiere über den Untersuchungszeitraum von maximal 21 Tagen um ca 15% zu, während diejenigen Tiere, die mit ihrem Erhaltungsbedarf ernährt wurden, im Gewicht lediglich um $\pm 5\%$ schwankten. Die Abb.21 verdeutlicht diesen Zusammenhang exemplarisch für ein ad libitum und ein kalorisch definiert ernährtes Tier: Sogar nach 66 Tagen liegt bei kalorisch reduzierter Nahrungszufuhr das Körpergewicht nur um 169 g (6%) unter dem Zielgewicht von 3000 g.

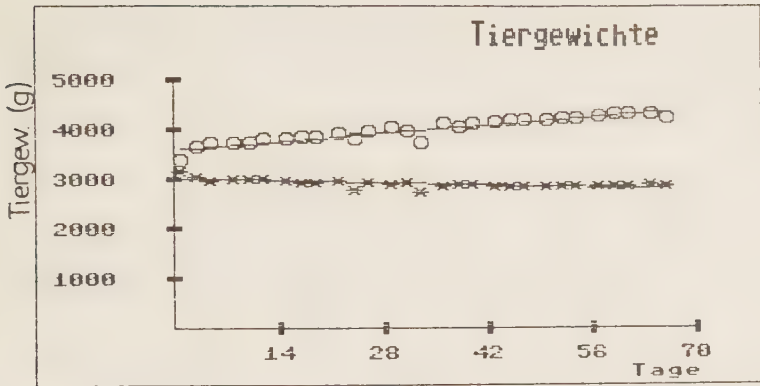


Abb.21: Körpergewichtsverlauf eines ad libitum ernährten NZW-Kaninchens ($\circ$ — $\circ$) und eines mit kalorisch definierter Menge von 1,3 MJ/d (310 kcal/d) ernährten Tiers ($\times$ — $\times$). Das ad libitum ernährte Tier nahm im Durchschnitt um 11,5 g pro Tag zu. Beiden Kaninchen stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Unterbringung erfolgte im abgeschlossenen Stallraum der Isotopenabteilung in V4A-Edelstahlkäfigen. Die Tiere erhielten über eine Schaltuhr einen künstlichen 12 h-Tag/12 h-Nacht-Rhythmus. Die mittlere Raumtemperatur betrug 23°C. (Siehe 2.4)

3.2.2 Glykogengehalt des Rohextraktes

Phosphorylase Kinase kann nur als Protein-Glykogenkomplex aus dem Muskelrohextrakt gefällt werden (HEILMEYER et al., 1970; VEH et al., 1980). Daher mußte untersucht werden, ob das Verabreichen einer kalorisch definierten Diät (Erhaltungsbedarf) zu Veränderungen im Glykogengehalt führt. Aus diesem Grunde wurden die beiden unterschiedlich ernährten Tiere (Abb.21) nach 66 Tagen geschlachtet und aus ihren Muskeln die Rohextrakte, wie im Methodenteil beschrieben, getrennt jedoch gleichzeitig hergestellt. In den erhaltenen Extrakten wurden dann der Glyko-

gengehalt (MONTGOMERY, 1957), sowie einige weitere Rohextraktparameter bestimmt (siehe Tab. 6). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Glykogengehalt des diätetisch gefütterten Tieres und des ad libitum ernährten Tieres.

Fütterung	Schlachtgew.	Muskel-	Glykogen	PhosKin-	PhosKin-	PhosKin-	spez.	extrahierte
Kanin 4	nach 66 Tagen	masse	gehalt	Aktivität	Menge*	$\frac{pH 6,8A}{pH 8,2A}$	Aktivität	Proteinmenge
	g	g	g/kg	$\frac{pH 6,2}{nKat/kg}$	mg/kg		$\frac{pH 6,2}{nKat/mg}$	g/kg
ad lib. (A)	4250	825	5,0	$4,88 \times 10^4$	319	0,013	1,5	32,2
100 g/d (B)	2831	415	5,3	$3,20 \times 10^4$	342	0,049	71	26,6
A/B	1,5	2,0	0,9	1,5	0,9	0,3	1,3	1,2

Tab.6: Vergleich der Rohextraktparameter eines ad lib. gefütterten NZW-Kaninchens (A) und eines im Erhaltungsbedarf ernährten Tieres (B).

* Die Menge der Phosphorylase Kinase wurde an Hand der früher ermittelten durchschnittlichen spezifischen Enzymaktivität von ca. 9000 U/mg (153 nkat/mg) bei pH 8,2 (JENNISEN et al. 1975) für das voll ernährte Tier ermittelt, für das im Erhaltungsbedarf ernährte Kaninchen wurde die in der vorliegenden Arbeit bestimmte, durchschnittliche spezifische Enzymaktivität von 93,5 nKat/mg (siehe Tab.7) zugrunde gelegt.

A/B gibt das Verhältnis der Daten des Rohextraktes des ad lib. ernährten Tieres zu denen des kalorisch definiert gefütterten Tieres wieder.

Für die biochemischen Parameter der beiden Rohextrakte ergaben sich diverse Unterschiede (1,2-1,5fach): Spezifische Enzymaktivität bei pH 8,2 und der extrahierte (lösliche) Proteingehalt. Die Verhältnisse dieser Werte korrelieren mit den Schlachtgewichten der Tiere. Der fast vierfach niedrigere Quotient aus der pH 6,8 und pH 8,2 Enzymaktivität spricht für eine etwas erhöhte Proteolyseempfindlichkeit der Phosphorylase Kinase im Rohextrakt des diätetisch ernährten Kaninchens.

3.2.3 Isolierung der doppelmarkierten Calmoduline

Die einzelnen Proteine wurden, wie im Methodenteil und im Kapitel über die Poolgrößenbestimmungen beschrieben, isoliert. In den folgenden Tabellen sind die quantitativen Verhältnisse der Reinigung der einzelnen doppelmarkierten Proteine wiedergegeben:

Phosphorylase Kinase-Reinigung										
PROTEIN					ENZYMAKTIVITÄT					
Schritt	Volumen	Konz.	Summe	Ausb./Schr.	Konz.	Summe	SA	Ausb./Schr.	Ausb./ges.	Anrei-
	ml	mg/ml	mg	%	nkcat/ml	nkcat	nkcat/mg	%	%	cherung
<u>Zentrif.:</u>										
Rohextr.	3 100,0	18,60	57 660,0	100,0	22,2	68 714	1,2	100,0	100,0	1,0
<u>Säuref.:</u>										
Säure-S	3 000,0	13,07	39 210,0	68,0	0,5	1 428	0,0	2,1	2,1	/
<u>Ultras.:</u>										
30-S	200,0	11,07	2 214,0	3,8	123,9	24 786	11,2	36,1	36,1	9,3
<u>Gelfil.:</u>										
4B-Auf.	55,0	10,14	557,7	25,2	172,6	9 495	17,0	38,3	13,8	14,2
4B-Pool	665,0	0,43	286,0	51,3	10,1	6 704	23,4	70,6	9,8	19,5
<u>DEAE-Cell:</u>										
DI-Pool	232,0	0,23	53,4	18,7	19,7	4 559	85,4	68,0	6,6	71,2
Phos Kin	18,6	2,50	46,5	87,1	233,8	4 348	93,5	95,4	6,3	78,6

Tab.7: Reinigung der Phosphorylase Kinase, die zur Turn-overmessungen eingesetzt wurde.

(Weiße Neuseeländer-Kaninchen, mit EGTA extrahiert, aus 2 kg Muskel).

SA = spezifische katalytische Aktivität der Phos Kin, alle Aktivitäten sind bei pH 8,2 gemessen.

S = Sedimentationsüberstand.

30-S = Überstand der Ultrazentrifugation im Ti-45 Rotor, bei 30 000 UPM (75 000 g).

4B = Sepharose 4B.

DI = erster auf DEAE-Cellulose erhaltener Pool.

Wie man der Tabelle 7 entnehmen kann, liegt die absolute isolierte Phosphorylase Kinase-Menge bei etwa 50 mg bei einer Präparation, für die gewöhnlich ca. 2 Kg Skelettmuskel eingesetzt werden. Dies entspricht einer rein isolierten Menge von ca 25 mg Kinase pro kg Skelettmuskel. Dies ist weniger als bislang von COHEN (1973) beim weißen Neuseeländer-Kaninchen beschrieben (43 mg/kg). Ebenso liegt die auf den Rohextrakt bezogene Enzymausbeute bei der gezeigten Präparation unter 10%, während die Literatur (COHEN, 1973) von 15% spricht, wogegen bei Standardextraktion dieser Kinase ohne EGTA (siehe Tab.2) Ausbeuten von über 25% erreicht wurden. Dieser Unterschied könnte, ebenso wie die etwa um ein Drittel erniedrigte spezifische Enzymaktivität (gegenüber der Kinase in Tab.2), eine Auswirkung der für die Experimente notwendigen, besonderen Ernährungssituation der Tiere, sowie der Extraktion der Phosphorylase Kinase mit EGTA, sein (siehe 2.1.3).

Reinigung von Delta

Schritt	PROTEIN			
	Volumen	Konz.	Summe	Ausb/ges.
	ml	mg/ml	mg	%
Delta, theor.	/	/	2,30	100,0
<u>Hitzeschr.:</u>				
Kochübers.	26,00	0,11	2,90	n.b.
<u>FP-Seqh.:</u>				
FP-Durchl.	29,00	0,01	0,29	n.b.
FP-NaCl	21,10	0,02	0,46	n.b.
FP-Pool	13,00	0,12	1,56	67,8
<u>TCA-Fäll.:</u>				
Delta (rein)	1,45	0,83	1,20	52,2

Tab. 8

Tab.8: Reinigung der Delta-Untereinheit aus Phosphorylase Kinase zur Verwendung bei Turnovermessungen.

46,3 mg Holokinase (2,5 mg/ml), entsprechend 2,30 mg Delta (theoretischer 100%-Wert für die Berechnung der Gesamtausbeute, Deltamasse=1/20 der Kinasemasse), wurde in ihrem Aufbewahrungspuffer (siehe 2.1.3) 7 min im Aluminiumblock auf 96° C erhitzt. Der Kochüberstand wurde dann Calcium-abhängig auf Fluphenazin-Sephrose (FP-Seph) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit abgewandeltem (2.1.4) Puffer C (10 mM EGTA).

Eine weitergehende Reinigung der Delta-Untereinheit war nicht erforderlich. Weitere Einzelheiten siehe Text und 2.1.4.

n.b.: nicht bestimmt

Für die Reinigung der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase genügte nach dem Kochen der Kinase ein einziger Schritt, nämlich die Calcium-abhängige Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sephrose. Die Chromatographie fand im Mikromaßstab statt: Das Säulenvolumen betrug 0,3-0,5 ml gepacktes Affinitätsgel. Als Säulenmantel dienten Insulinspritzen (Querschnitt: ca. 4 mm). Für jede Chromatographie wurde stets neues Gelmaterial eingesetzt. Ein Nachreinigungsschritt war nicht notwendig, da elektrophoretisch homogenes Delta isoliert wurde (Tab.8).

Durch diese Affinitätsreinigung konnte die Delta-Einheit innerhalb von drei Stunden aus der Kinase isoliert werden. Dies ist ein wesentlicher Zeitgewinn im Vergleich zu den früher beschriebenen Methoden (24h, PETERSEN, 1981, COHEN et al., 1978).

In den Tabellen 9 und 10 sind die quantitativen Verhältnisse der Reinigungen von freiem Calmodulin, von Calmodulin aus Myofibrillen, sowie der Isolierung von TNC gezeigt:

Reinigung des freien CaM

Schritt	PROTEIN		
	Volumen ml	Konz. mg/ml	Summe mg
<u>Säuref.:</u>			
Säure-S	3 000,0	13,10	39 210,0
<u>FP-Seph.:</u>			
FP-Durchl.	4 900,0	6,20	30 584,0
FP-NaCl	1 800,0	4,70	8 460,0
FP-Pool	62,0	0,30	18,6
<u>DEAE-Cel.:</u>			
DEAE-Auf.	12,5	0,75	9,4
freies CaM (rein)	5,0	1,50	7,5

Tab.9: Reinigung des zu Turnovermessungen verwendeten freien CaM.

Säure-S: Überstand der Säurefällung der PhosKin. Weitere Abkürzungen, siehe Legende Tab.10

Reinigung von myo-CaM und TNC

Schritt	PROTEIN		
	Volumen ml	Konz. mg/ml	Summe mg
<u>Hitzes.:</u>			
Myo-Koch-S	4 600,0	5,10	23 460,0
<u>FP-Seph.:</u>			
FP-Durchl.	5 000,0	3,38	16 900,0
FP-NaCl	2 300,0	2,10	4 832,0
FP-Pool	200,0	0,23	46,0
<u>DEAE-Cel.:</u>			
DEAE-Auf.	14,0	2,30	32,2
Myo-CaM (rein)	5,5	1,70	9,4
TNC (rein)	9,5	0,40	3,8

Tab.10

Tab.10: Reinigung von doppelmarkiertem CaM und TNC aus Myofibrillen zur Verwendung bei den Turnovermessungen. Aus den Myofibrillen wurde zunächst das nicht integrale CaM unter Verwendung von Calcium-Chelatoren (siehe 2.1.7) extrahiert. Anschließend erhitzte man das Myofibrillenhomogenat, um integral gebundenes CaM frei zu setzen. Der nach dem Hitzeschritt anfallende Überstand wird mit Myo-Koch-S bezeichnet. Der erste Pool der DEAE-Cellulose-Chromatographie enthält CaM, der zweite, kleinere enthält TNC (vergleiche Chromatogramm in Abb.19 B & C).
FP-Seph.: Fluphenazin-Sepharose
DEAE-Cel: DEAE-Cellulose

Aus der Poolgröße für das freie Calmodulin von 20 mg/kg Muskel (siehe Tab.5) folgt, daß die Isolierung dieses Calmodulins mit einer Ausbeute von ca. 19% verläuft (3,8 mg/kg Muskel; die halben Tabellenwerte, da für die Präparationen immer 2 kg Kaninchenskelettmuskel eingesetzt wurden). Im Falle der Isolierung von Calmodulin aus Myofibrillen ergibt sich mit der errechneten durchschnittlichen Poolgröße von 89,5 mg/kg Muskel (Tab.5) eine Ausbeute von lediglich ca. 5%. Dieser Unterschied liegt wohl darin begründet, daß die Präparation aus Myofibrillen aufgrund der Hitzekoagulate verlustreicher verläuft als die des freien Calmodulins. Da sich jedoch mit dem geschilderten Verfahren akzeptable, d.h. zur Radioaktivitätsmessung ausreichende Proteinmengen erhalten ließen, wurde die Reinigungsmethode für Calmodulin aus Myofibrillen nicht weiter verbessert.

In Abb.22 ist eine SDS-Gelelektrophorese der doppelmarkierten Phosphorylase Kinase, sowie der einzelnen endgereinigten doppelmarkierten Calmoduline, die zu Turnover-Untersuchungen eingesetzt wurden, gezeigt. Da dieses SDS-Gel unter den Bedingungen von WILLIAMS et al., 1984 mit und ohne Calcium-Ionen angefertigt wurde, kann man bereits hier Rückschlüsse auf die biologische Aktivität der erhaltenen Calmoduline ziehen: Alle drei rein isolierten Calmoduline zeigen die im vorigen Kapitel beschriebene Ca^{2+} -abhängige Änderung der elektrophoretischen Mobilität. Dabei zeigt TNC einen deutlich kleineren "Sprung" als die Calmoduline. Im Calmodulin-Aktivierungstest der Phosphorylase Kinase (JENNISSEN et al., 1974; BöHM et al., 1985) zeigte die isolierte Kinase mit allen gereinigten Calmodulinen bei pH 6,8

eine 3-6fache Steigerung der Enzymaktivität. Mit TNC wurde lediglich eine 1,5fache Aktivierung erreicht. Diese Ergebnisse bedeuten, daß das gesamte System Phosphorylase Kinase und die drei separat isolierten einzelnen Calmoduline biologisch aktiv sind und demnach während den Präparationen nur wenig Schaden genommen haben. Die beim TNC beobachtete Aktivitätssteigerung von ca 1,5fach kommt gut an die Literaturwerte heran, da diese mit relativ großen Schwankungen von 2-10facher Aktivierung der Phosphorylase Kinase angegeben werden (EDELMAN et al., 1987).

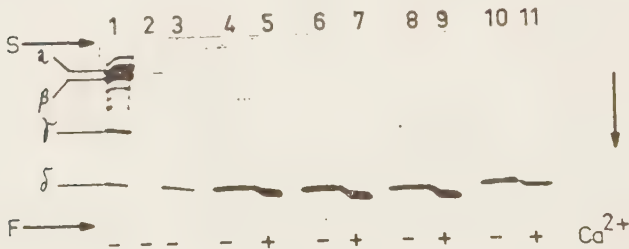


Abb.22: Endprodukte der zu Turnovermessungen verwendeten doppelmarkierten Proteine.

Coomassie-Färbung einer SDS-Gelelektrophorese (8-20% linearer Polyacrylamid-Gradient) nach LAMMLI, 1970 unter den Bedingungen von WILLIAMS et al., 1984.

S = Start, F = Front, der vertikale Pfeil zeigt die Laufrichtung an. "+" oder "-" unter einer Spur gibt an, ob der entsprechende Elektrophoreseschacht Calcium-Ionen enthielt oder nicht.

- Spur 1: 25 µg Phos Kin, deren Untereinheiten folgende Molekularmassen zeigen (JENNISSEN et al., 1985):
alpha: 140 KDa, beta: 123 KDa, gamma: 42 KDa, delta = CaM: 17 KDa.
- Spur 2: 5 µg Phos Kin-Kochpellet (siehe Methodenteil).
- Spur 3: 2 µg Phos Kin-Kochüberstand.
- Spur 4/5: 4 µg Delta-Untereinheit.
- Spur 6/7: 4 µg freies CaM.
- Spur 8/9: 4 µg aus Myofibrillen isoliertes integrales CaM.
- Spur 10/11: 3 µg aus Myofibrillen isoliertes TNC.
- In den Spuren 10/11 ist der deutlich kleinere +/- Ca²⁺- "Sprung" des TNC gegenüber den "Calmodulin-Sprüngen" erkennbar.

3.2.4 Bestimmung der spezifischen Radioaktivitäten in den doppelmarkierten Proteinen.

Die einzelnen ^3H und ^{14}C -doppelmarkierten Calmoduline, sowie TNC wurden, wie zuvor beschrieben isoliert und der Proteingehalt im automatischen Test nach LOWRY et al., 1951 bestimmt. Dann wurde, wie in Kapitel 2.6.8.2 Radioaktivität gemessen. Da diese für zwei verschiedene Proteinkonzentrationen bestimmt wurde, ergaben sich für jedes vermessene Protein 6-10 Meßwerte. Die erhaltenen Impulse pro Minute (cpm) wurden dann mit Hilfe einer für jede Szintillator-Batch neu angefertigten Quenchkurve in die entsprechenden Zerfälle pro Minute (dpm) umgerechnet. Hierbei wurde berücksichtigt, daß stets eine Überstrahlung (Overspill) vom ^{14}C -Kanal in den ^3H -Kanal stattfindet. Dieser Effekt ist quenchainhängig und liegt in der Größenordnung von ca 21 % (genauerer siehe 2.6.8.2).

Dann bestimmte man zunächst die auf die Proteinmasse bezogene spezifische Radioaktivität der beiden Isotope. Aus Gründen der Normierung wurden diese Werte mit dem für jedes Protein charakteristischen Leucin-Gehalt in die auf Leucin bezogenen spezifischen Radioaktivitäten umgerechnet. Für Calmodulin ergibt sich ein Wert von 0,53 μmol Leucin pro mg Protein (GRAND et al., 1981; NAIRN et al., 1984). Für Troponin C läßt sich aus der Sequenz ein Wert von 0,50 μmol Leucin pro mg Protein entnehmen (COLLINS et al., 1973; DAYHOFF, 1976).

In den nachstehenden Tabellen sind die spezifischen Radioaktivitäten der verschiedenen untersuchten, doppelmarkierten Proteine gezeigt:

^3H -Leu-		spez. ^3H -Rad.		spez. ^{14}C -Rad.		n
Exp. Inkorp.-	Dauer					
Nr.	Tage	dpm/mg	dpm/ μmol Leu	dpm/mg	dpm/ μmol Leu	
1	2	4548 $\pm$ 16	8581 $\pm$ 30	/	/	5
2	6	4850 $\pm$ 36	9151 $\pm$ 72	1229 $\pm$ 4	2319 $\pm$ 8	6
3a	11	1925 $\pm$ 6	3632 $\pm$ 11	1253 $\pm$ 3	2364 $\pm$ 6	10
3b	11	3050 $\pm$ 23	5755 $\pm$ 43	1344 $\pm$ 9	2536 $\pm$ 17	6
3*	11	2488 $\pm$ 563	4694 $\pm$ 1062	1299 $\pm$ 46	2451 $\pm$ 87	/
4	20	1269 $\pm$ 8	2394 $\pm$ 10	938 $\pm$ 4	1770 $\pm$ 8	10
5	21	1411 $\pm$ 13	2662 $\pm$ 25	940 $\pm$ 9	1774 $\pm$ 17	5

Tab.11: Spezifische Radioaktivitäten des freien CaM

3*: Mittelwert aus 3a und 3b (theoretisches n=16).

n: Summe aller Zählmessungen bei zwei verschiedenen eingesetzten Proteinmengen.

CaM enthält pro mg 0,53 μmol Leucin.

^3H -Leu-		spez. ^3H -Rad.		spez. ^{14}C -Rad.		n
Exp. Inkorp.-	Dauer					
Nr.	Tage	dpm/mg	dpm/ μmol Leu	dpm/mg	dpm/ μmol Leu	
1	2	4105 $\pm$ 8	7745 $\pm$ 15	/	/	5
2	6	4471 $\pm$ 19	8436 $\pm$ 36	942 $\pm$ 4	1777 $\pm$ 8	6
3a	11	2256 $\pm$ 3	4257 $\pm$ 6	1133 $\pm$ 1	2138 $\pm$ 2	10
3b	11	2941 $\pm$ 2	5360 $\pm$ 4	1019 $\pm$ 5	1923 $\pm$ 9	6
3*	11	2549 $\pm$ 293	4809 $\pm$ 552	1076 $\pm$ 57	2031 $\pm$ 108	/
4	20	1317 $\pm$ 4	2485 $\pm$ 8	926 $\pm$ 3	1747 $\pm$ 6	10
5	21	1515 $\pm$ 13	2858 $\pm$ 25	879 $\pm$ 7	1658 $\pm$ 13	5

Tab.12: Spezifische Radioaktivitäten der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase

3*: Mittelwert aus 3a und 3b (theoretisches n=16).

n: Summe aller Zählmessungen bei zwei verschiedenen eingesetzten Proteinmengen.

CaM enthält pro mg 0,53 μmol Leucin.

³H-Leu-

Exp. Inkrp.-		spez. ³ H-Rad.		spez. ¹⁴ C-Rad.		
Nr.	Dauer					n
	Tage	dpm/mg	dpm/μmol Leu	dpm/mg	dpm/μmol Leu	
1	2	4324± 61	8158±104	/	/	5
2	6	4304± 50	8121± 94	995±14	1877± 26	6
3a	11	3457± 44	6523± 83	1260±13	2377± 25	10
3b	11	2939± 7	5445± 13	1092± 8	2060± 15	6
3*	11	3198±259	6034±489	1176±84	2219±159	/
4	20	1395± 20	2632± 38	845± 2	1594± 4	10
5	21	/	/	/	/	/

Tab.13: Spezifische Radioaktivitäten des myofibrillären Calmodulins

3*: Mittelwert aus 3a und 3b (theoretisches n=16).

n : Summe aller Zählmessungen bei zwei verschiedenen eingesetzten Proteinmengen.

CaM enthält pro mg 0,53 μmol Leucin.

³H-Leu-

Exp. Inkrp.-		spez. ³ H-Rad.		spez. ¹⁴ C-Rad.		
Nr.	Dauer					n
	Tage	dpm/mg	dpm/μmol Leu	dpm/mg	dpm/μmol Leu	
1	2	3948± 13	7896± 27	/	/	5
2	6	2533± 16	5066± 32	616± 4	1232± 8	6
3a	11	3821± 3	7642± 6	902± 1	1804± 2	10
3b	11	2528±316	5056±632	683± 26	1366± 52	6
3*	11	3175±647	6350±1294	793±110	1586±220	/
4	20	1136± 4	2272± 4	483± 1	966± 2	10
5	21	/	/	/	/	/

Tab.14: Spezifische Radioaktivitäten des aus Myofibrillen isolierten Troponin C.

3*: Mittelwert aus 3a und 3b (theoretisches n=16).

n : Summe aller Zählmessungen bei zwei verschiedenen eingesetzten Proteinmengen.

TnC enthält pro mg 0,50 μmol Leucin.

3.2.5 Verlaufskurven der spezifischen ^3H -Radioaktivität

Um eine Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der spezifischen ^3H -Radioaktivität zu erhalten sowie mögliche Unterschiede im Degradationsverhalten der einzelnen Calmoduline zu erkennen, wurde die spezifische Radioaktivität als Funktion der ^3H -Leucin-Inkorporationsdauer aufgetragen (Abb.23).

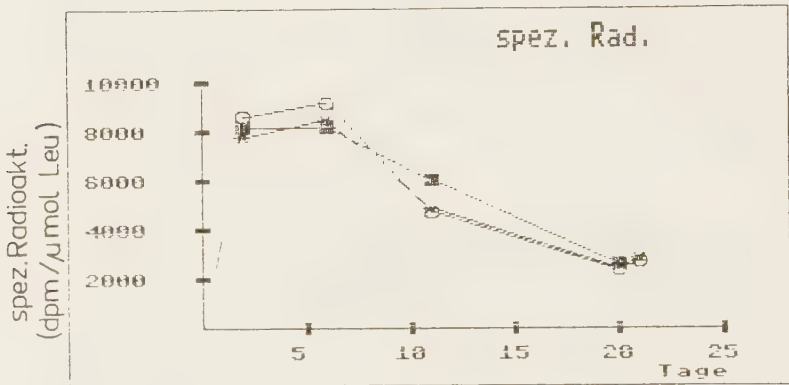


Abb.23: Verlauf der spezifischen ^3H -Radioaktivität als Funktion der Inkorporationsdauer von ^3H -Leucin.

○—○: freies Calmodulin

×—×: Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase

■—■: Calmodulin aus Myofibrillen

Wie aus der vorherigen Abbildung ersichtlich ist, liegen die auf Leucin bezogenen spezifischen Radioaktivitäten aller Proteine zu jedem gemessenen Zeitpunkt zu eng beieinander, um signifikante Unterschiede evident werden zu lassen. Ein Vergleich mit den Meßdaten des mitgereinigten TNC, einem vom Calmodulin stark verschiedenem Protein (158

Aminosäuren, kein Trimethyllysin, gegenüber CaM mit 148 Aminosäureresten und einem Trimethyllysin in Position 115, vergleiche Abb.1.1 & 25A) zeigt lediglich am 6. Tag nach ^3H -Leucin Injektion eine eindeutig niedrigere spezifische Radioaktivität als die Calmoduline. Dies legt die Vermutung nahe, daß man bei drei vermutlich sequenzidentischen Proteinen, wenn überhaupt, nur mit geringen Unterschieden rechnen darf.

3.2.6 Abschätzung der Halbwertszeiten der isolierten Calmoduline

Die grundlegenden kinetischen Eigenschaften von Turnoverexperimenten sowie Ermittlung von Halbwertszeiten bei kleinen Tracermolekülen sind 1943 von ZILVERSMIT et al. abgehandelt worden. Erst 17 Jahre später wurden die mathematischen Modelle verfeinert und ergänzt (ZILVERSMIT, 1960).

Die Differentialgleichung (4) wurde von JOHNSON & VELICK (1972) erstmals auf ein Protein angewandt, wobei dessen Konzentration über einen längeren Zeitraum konstant bleiben muß. Dabei kann die Änderung der spezifischen Radioaktivität im Protein zu jedem beliebigen Zeitpunkt nach Gabe eines radioaktiven Pulses wie folgt berechnet werden:

$$c * (ds/dt) = K_0 * P(t) - K_1 * c * S(t) \quad (4)$$

Die benutzten Variablen haben folgende Bedeutung:

c : Proteinkonzentration

$P(t)$: spezifische Radioaktivität des Präkursorpools zur Zeit t

$S(t)$: spezifische Radioaktivität des Proteins zur Zeit t

K_0 : Geschwindigkeitskonstante 0. Ordnung für die Proteinsynthese

K_1 : Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung für den Proteinabbau

Da im Fließgleichgewicht gleiche Mengen eines Proteins synthetisiert und abgebaut werden, gilt demnach auch folgende Beziehung (JOHNSON & VELIK, 1972):

$$K_s = K_D * c \quad (5)$$

Da die Degradation nach einer Kinetik 1. Ordnung verläuft, fallen die Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität in den Proteinen exponentiell ab. Es ist daher mathematisch zulässig, diesen Teil der Kurve durch Logarithmieren zu linearisieren. Diese linearisierte Form der Degradationsbeschreibung der markierten Polypeptide kann durch Regressionsanalyse bestimmt werden. Man erhält eine Gleichung von der Form:

$$\ln S(t) = S(0) + K_{D,apparent} * t \quad (6)$$

In Gleichung (6) haben die Variablen folgende Bedeutung:

$S(0)$: Durch lineare Regression extrapolierte spezifische Radioaktivität des untersuchten Proteins zur Zeit $t=0$

$K_{D,apparent}$: Apparente Geschwindigkeitskonstante für die Protein-degradation

Aus Gleichung (6) ergibt sich dann die apparente Halbwertszeit zu:

$$T_{1/2,apparent} = \ln 2 / K_{D,apparent} \quad (7)$$

In den Gleichungen (6) und (7) wird der Index "apparent" benutzt. Das rührt daher, daß durch die Linearisierung des Abbaus der spezifischen Radioaktivität in den untersuchten Polypeptiden nach Pulsmarkierung zu große Halbwertszeiten vorgetäuscht werden (JOHNSON et al. 1972; ZAK et al., 1979; MASTERS 1982). Der Grund liegt darin, daß die markierten Aminosäuren nicht so schnell wie angenommen aus dem Aminosäurepool des

Körpers ausgeschieden werden. Dadurch kommt es zu einer Wiederverwendung ("Recycling") dieser Aminosäuren für den erneuten Einbau in Polypeptidketten. Dieser Mechanismus erklärt das zu langsame Abfallen der spezifischen Radioaktivität in den betrachteten Proteinen. Das in der vorliegenden Arbeit zur Markierung verwendete radioaktive Leucin gehört zu denjenigen Aminosäuren mit mäßigem Wiederverwendungsgrad (JOHNSON et al., 1972; MASTERS, 1982).

In Arbeiten von PETERSEN (1981) wurden unter anderem apparente Halbwertszeiten der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase gemessen. Dabei lag die für die Delta-Untereinheit ermittelte apparente Halbwertszeit bei 7,0 Tagen. Zur Berechnung der korrigierten Halbwertszeit des integralen Calmodulins der Phosphorylase Kinase (Delta-Untereinheit) wurde ein mathematisches Turnover-Modell (ZAK et al., 1979) zugrunde gelegt, welches das Aminosäure-Recycling berücksichtigt. Die Computer-Auswertung dieses Modells ergab dann eine korrigierte Halbwertszeit von 0,4 Tagen. Dies entspricht einer um den Faktor 17,5 kleineren Halbwertszeit als die zuvor ermittelte apparente von 7,0 Tagen.

Da in der vorliegenden Arbeit für alle drei isolierten Calmoduline apparente Halbwertszeiten in der Größenordnung von 7,7 bis 8,7 Tagen errechnet werden konnten, legte dieser Befund eine Abschätzung der korrigierten Halbwertszeiten der Calmoduline nahe. Die nachstehende Tabelle (Tab.15) zeigt die apparente Geschwindigkeitskonstante für den Abbau, die apparente Halbwertszeit, den auf $t=0$ extrapolierten Anfangswert sowie die oben beschriebene Recycling-korrigierte Halbwertszeit nach den Ergebnissen von PETERSEN (1981):

Protein	S(0)	$K_D, app.$ (Tage^{-1})	$T_{1/2, app.}$ (Tage)	$T_{1/2, corr.}$ (Tage)	r^2	n
freies CaM	15 214±1830	-0,09±0,01	7,7±0,9	0,44±0,05	0,98	4
Delta	12 965±1821	-0,08±0,01	8,7±1,1	0,50±0,06	0,97	4
Myo-CaM	13 227± 40	-0,08±0,00	8,7±0,0	0,50±0,00	1,00	3
TNC	8 185±1578	-0,06±0,02	11,6±3,9	/	0,96	3

Tab.15

Tab.15: Aus den Verlaufskurven der spezifischen ^3H -Radioaktivität durch lineare Regression der Meßdaten von 6-21 Tagen nach ^3H -Leucin-Injektion ermittelte apparente und korrigierte Halbwertszeiten der verschiedenen Calmoduline.

S(0): auf $t=0$ extrapolierte spezifische Radioaktivität.

Die apparenten Halbwertszeiten wurden aus den Gleichungen (6) und (7) ermittelt, die korrigierten wurden anhand von Daten über die Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase ($T_{1/2 \text{ app.}} = 7,0 \pm 0,7$ Tage) aus einer früheren Arbeit (PETERSEN, 1981) abgeschätzt.

app. : apparent

korrr.: korrigiert

Wie die Tabelle 15 zeigt, ergeben die nach ZAK (1979) und PETERSEN (1981) für das Leucin-Recycling korrigierten realen Halbwertszeiten ca 0,44 Tage (10,6 h) für das freie Calmodulin, ca 0,5 Tage für die integrale Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase und für das aus Myofibrillen isolierte Calmodulin. Aufgrund der überlappenden Standardfehler der errechneten Mittelwerte lassen sich mit dieser Methode noch keine signifikanten Unterschiede der isolierten Calmoduline aufzeigen. Ein Vergleich mit den in Tab.15 angegebenen Daten des ebenfalls isolierten Troponin C zeigt, daß sogar eine signifikante Differenzierung der apparenten Halbwertszeiten dieses Proteins sowie der apparenten Degradationskonstanten des TNC und der anderen Calcium-bindenden Polypeptide nicht möglich ist. Lediglich der auf $t=0$ extrapolierte Anfangswert der spezifischen Radioaktivität des Troponin C ist deutlich kleiner als die S(0)-Werte der Calmoduline.

3.2.7 Bestimmung der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnover-Quotienten der isolierten doppelmarkierten Calmoduline

Nachdem im vorherigen Kapitel aus der Abschätzung der verschiedenen Degradationsparameter eine dynamische Gleichheit der drei untersuchten Calmoduline nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten nun eventuell doch noch vorhandene Unterschiede mit einer weitaus empfindlicheren Methode untersucht werden. Hierzu diente, wie bereits einleitend erwähnt, die Doppelmarkierungstechnik, bei der zusätzlich zu einer ersten ^3H -Leucin-Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten (6-21 Tage) 24 h vor dem Schlachtttermin ein zweiter ^{14}C -Leucin-Puls erfolgt.

In den untersuchten Proteinen wurden, wie eingangs beschrieben, die in dpm umgerechneten ^3H - und ^{14}C -Daten ermittelt und die entsprechenden Quotienten aus ^{14}C -Wert und ^3H -Wert gebildet. Hierbei gilt allgemein, daß Proteine mit einem hohen Turnover große $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten und solche mit einem geringen Turnover kleine Quotienten aufweisen. Das Verhältnis der einzelnen $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten zueinander ist ein Maß für die relativen Turnoverraten, wenn auch keine direkte Linearität zwischen der Höhe des Turnovers und dem Verhältnis dieser Quotienten zueinander besteht. Die ermittelten Turnoverquotienten der untersuchten doppelmarkierten Polypeptide sowie die zugehörigen Standardfehler aus 5-16 Einzelmessungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

^3H -Leu-

Exp. Inkorp.-

Quotienten $\pm$ S.F.

Nr.	Dauer (Tage)	CaM_{frei}	$\text{CaM}_{\text{dest.}}$	$\text{CaM}_{\text{Myofibr.}}$	n
1*	2	0,254 $\pm$ 0,036	0,236 $\pm$ 0,002	0,249 $\pm$ 0,033	5
2	6	0,254 $\pm$ 0,002	0,221 $\pm$ 0,002	0,231 $\pm$ 0,003	6
3a	11	0,651 $\pm$ 0,007	0,502 $\pm$ 0,004	0,365 $\pm$ 0,007	10
3b	11	0,441 $\pm$ 0,003	0,359 $\pm$ 0,003	0,376 $\pm$ 0,003	6
3*	11	0,546 $\pm$ 0,070	0,431 $\pm$ 0,046	0,380 $\pm$ 0,011	/
4	20	0,739 $\pm$ 0,008	0,703 $\pm$ 0,005	0,606 $\pm$ 0,010	10
5	21	0,666 $\pm$ 0,003	0,581 $\pm$ 0,004	/	5

Tab.16: $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnoverquotienten der doppelmarkierten Calmoduline.

*Bei Versuch 1 wurde nur eine Einfachmarkierung mit ^3H -Leucin durchgeführt. Aus den Experimenten 6-21 Tage nach ^3H -Leucin-Injektion wurde ein Mittelwert für den konstanten 24 Stundenwert der ^{14}C -Radioaktivität gebildet und dieser zur Berechnung des Turnoverquotienten für das Experiment am 2. Tag eingesetzt.

3*: Mittelwerte aus 3a & b, theoretisches n =16.

Alle angegebenen Turnoverdaten wurden aus den für Quenchung und Overspill korrigierten wahren Zerfallsdaten (dpm) errechnet (2.6.8.2).

S.F.: Standardfehler

Die nächste Tabelle gibt die Turnoverquotienten des Vergleichsproteins Troponin C wieder:

³ H-Leu-			
Exp. Nr.	Inkorp.- Dauer (Tage)	Quotient+S.F. TNC	n
1*	2	0,185+0,029	5
2	6	0,243+0,003	6
3a	11	0,236+0,002	10
3b	11	0,273+0,007	5
3*	11	0,255+0,040	/
4	20	0,425+0,010	10

Tab.17: ¹⁴C/³H-Turnoverquotienten des doppelmarkierten TNC

*Bei Versuch 1 wurde nur eine Einfachmarkierung mit ³H-Leucin durchgeführt. Aus den Experimenten 6-21 Tage nach ³H-Leucin-Injektion wurde ein Mittelwert für den konstanten 24 Stundenwert der ¹⁴C-Radioaktivität gebildet und dieser zur Berechnung des Turnoverquotienten für das Experiment am 2. Tag eingesetzt.

3*Die angegebenen Quotienten sind Mittelwerte von 3a & b. Alle angegebenen Turnoverdaten wurden aus den für Quenchung und Overspill korrigierten wahren Zerfallsdaten (dpm) errechnet.

S.F.: Standardfehler

Wegen der nur geringen zu erwartenden möglichen Unterschiede der Turnoverquotienten wie auch aus Kostengründen wurde beim ersten Experiment (2 Tage ³H-Leucin-Inkorporationsdauer) auf einen zusätzlichen ¹⁴C-Leucin-Puls verzichtet. Stattdessen wurde für jedes untersuchte Protein der Mittelwert der zu allen anderen vermessenen Zeitpunkten (6-

21 Tage ^3H -Leucin-Inkorporationsdauer) verfügbaren ^{14}C -Daten (konstante 24 h-Inkorporationsdauer) gebildet. Dieser Wert wurde dann benutzt um einen theoretischen $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten für den zweiten Tag nach ^3H -Leucin-Injektion zu bestimmen.

Die Turnoverquotienten liegen für alle Calmoduline zwischen 0,24 (zweiter Tag nach der ^3H -Leucin-Applikation) und ca 0,7 am 20. Tag.

Die nachfolgende Abbildung stellt den Verlauf der Turnoverquotienten als Funktion der ^3H -Leucin-Inkorporationsdauer dar. Ferner sind in derselben Abbildung die erhaltenen Quotienten des Vergleichsproteins Troponin C mit abgebildet:

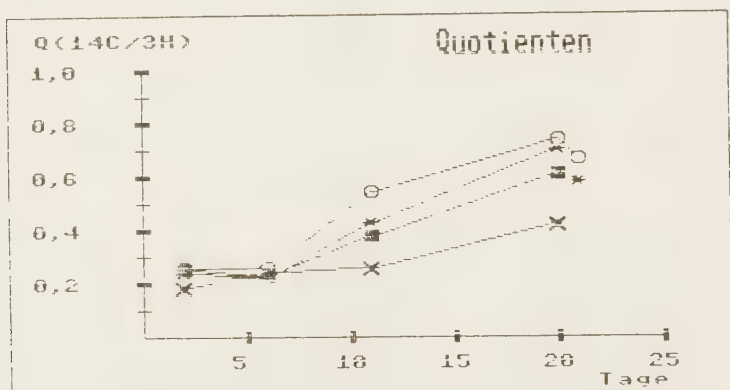


Abb. 24: Verlauf der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnoverquotienten der untersuchten doppelmarkierten Polypeptide als Funktion der Inkorporationsdauer von ^3H -Leucin. Die Standardfehler liegen maximal in der Größenordnung der Symbolgröße.

- : freies Calmodulin
- *—* : Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase
- : Calmodulin aus Myofibrillen
- x—x : Vergleichsprotein (Troponin C)

3.2.8 Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools

An Hand der vorherigen Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Turnoverquotienten kann man im Gegensatz zum zeitlichen Verlauf der spezifischen ^3H -Radioaktivitäten Unterschiede in den einzelnen Calmodulinen und im Vergleichsprotein Troponin C erkennen: Am zweiten und sechsten Tag nach der Erstpulsgabe von ^3H -Leucin fallen die (theoretisch) bestimmten $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten mit Ausnahme desjenigen von TNC im Rahmen der Meßgenauigkeit zusammen, wogegen man am 11. Tag nach Erstmarkierung mit ^3H -Leucin eine deutliche Aufspreizung der Turnoverquotienten der drei Calmoduline und einen noch markanteren Unterschied zum Troponin C findet. Am 20. und 21. Tag nach ^3H -Leucin-Inkorporation wird die dynamische Differenzierung der Calmoduline vom TNC noch bedeutsamer, während die Unterschiede der verschiedenen Calmoduline wieder kleiner werden.

Die prozentualen Unterschiede der drei Calmoduline, alle bezogen auf das freie Calmodulin (größter Turnoverquotient) nebst ihren Standardfehlern, sind in der nächsten Abbildung (Abb.25) demonstriert.

Wie man an Hand des Histogramms in Abb.25 sieht, finden sich die maximalen Abweichungen der Turnoverquotienten am 11. Tag nach Erstapplikation von ^3H -Leucin. Dies gilt für alle untersuchten Calmoduline und für das Troponin C. Zu diesem Zeitpunkt liegen offenbar optimale Verhältnisse von Proteindegradation und Proteinsynthese vor, sodaß hier auch kleinste Unterschiede im dynamischen Verhalten zwischen den drei Calmodulinen selbst sowie zum TNC zu Tage treten.

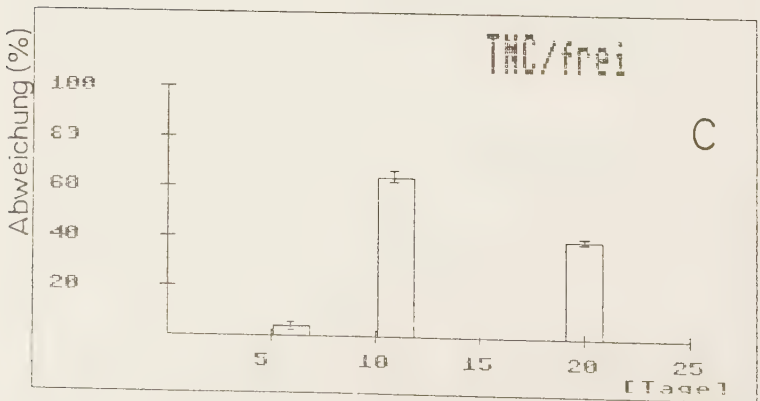
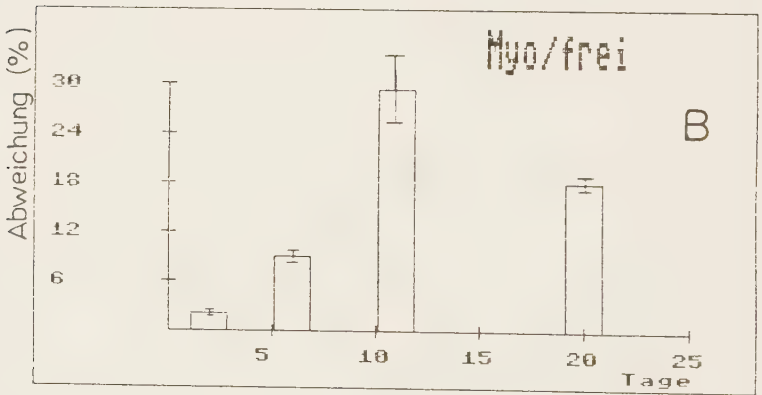
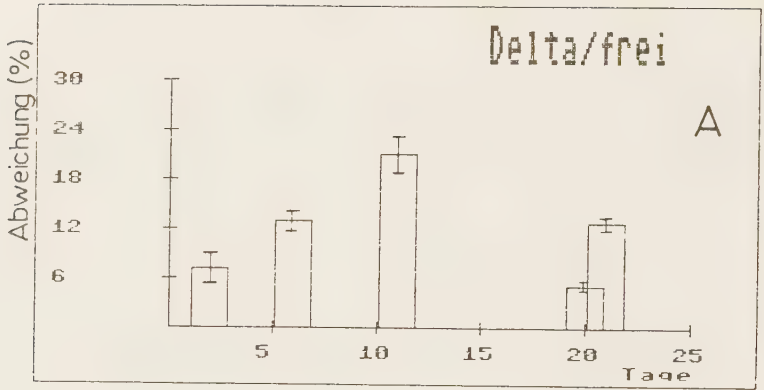


Abb.25: Prozentuale Unterschiede der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnoverquotienten, normiert auf freies Calmodulin.

Die obere Abbildung (A) gibt die Verhältnisse für die statistisch gepaarten (siehe p-Werte in der Tabelle in 7.2) Unterschiedswerte von: Delta-Untereinheit und freiem CaM wieder. Die mittlere Graphik (B) demonstriert den Unterschied zwischen myofibrillärem Calmodulin und freiem CaM. Die untere Darstellung (C) zeigt die gefundenen Differenzen zwischen dem Vergleichsprotein Troponin C und freiem Calmodulin.

Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Bei diesen sind die Fehlervergrößerungen, die durch Division und Differenzbildung der Meßdaten zustande kommen, berücksichtigt. In (C) ist aus praktischen Gründen für die Ordinate ein anderer Maßstab gewählt als in (A) und (B).

3.2.8.1 Fehlerbetrachtung und Signifikanzanalyse der Turnover-Unterschiede der Calmoduline

Zu den in der vorliegenden Arbeit angegebenen Standardfehlern (insbesondere denen der Turnoverquotienten sowie deren prozentuale Differenzen), also dem mittleren Fehler des Mittelwerts einer Meßreihe, muß folgendes bemerkt werden (vergleiche auch 2.6.8.3):

1. Für jedes durchgeführte Turnoverexperiment (insgesamt sechs zu fünf unterschiedlichen ^3H -Inkorporationszeiten) wurden vier Kaninchen benutzt (konstante Haltungsbedingungen, siehe 2.4; kalorisch definierte Diät, siehe 3.2.1). Das Körpergewicht der Tiere blieb, wie eingangs gezeigt, über den Untersuchungszeitraum konstant ($\pm 5\%$).

2. Die aus den Zerfallsdaten ermittelten Standardfehler der Turnoverquotienten wurden dann für die Quotientenbildung nach FENNER (1931) und SACHS (1983) korrigiert. Dieser für die Division bereinigte Standardfehler lag für alle Quotienten zwischen 1,3 und 2,0%.

Ein größerer Fehler resultierte aus der Mittelung über zwei am 11. Tag nach $^3\text{Leucin}$ -Applikation durchgeführte Präparationen. Hier ergaben sich Standardfehler von 3-13%.

3. Die durch die Differenzbildung mitveränderten Standardfehler der Turnoverquotienten bei der Bestimmung der Abweichungen der einzelnen Quotienten voneinander wurden ebenfalls nach FENNER und SACHS korrigiert. Hierbei ergaben sich divisions- und differenzbedingte Standardfehler am 11. Tag (maximaler Unterschied der Calmoduline) von 6-14%, selbst dann noch, wenn über zwei verschiedene zur Reproduktion der maximalen Effekte durchgeführte Präparationen gemittelt wurde.

Die größten auftretenden Quotientenunterschiede sind diejenigen am 11. Tag nach ^3H -Leucin-Injektion. Hier sticht das TNC mit 64% (auf das

freie bezogen) hervor. Da jedoch die Calmodulin-Unterschiede erheblich kleiner sind (20-30%), muß eine Signifikanzanalyse durchgeführt werden, um die vorgelegten Daten endgültig im Sinne einer Kompartimentierung dreier dynamisch verschiedener Calmoduline interpretieren zu können.

Da die Quotienten die Anforderung des Datenniveaus einer Verhältnisskalierung erfüllen, also ein echter Nullpunkt existiert (keine Markierung mit ^{14}C -Leucin, dann ist $Q=0$), wurden hierzu verschiedene zweiseitige (MÜLLER et al., 1983) Varianten des "t-Tests" benutzt:

1. Es wurde geprüft, ob alle erhaltenen Calmodulin-Quotienten eines Tages Streuungen um ein und denselben Mittelwert darstellen.

Diese Nullhypothese wurde mit 99%-iger Sicherheit abgelehnt, dh. es existieren Unterschiede, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit 1% beträgt.

2. Es wurde geprüft, ob paarweise Meßreihen der Calmodulin-Quotienten sich signifikant unterscheiden.

Diese Hypothese konnte auf dem 2%-Niveau für die gepaarten Meßwerte: freies CaM/ Delta und freies CaM/CaM aus Myofibrillen bestätigt werden (siehe Anhang 7.2).

Dieses Signifikanzniveau konnte auch dann noch beibehalten werden, wenn die Anzahl der Freiheitsgrade halbiert wurde.

Mit den zuvor aufgeführten Fehler- und Signifikanzanalysen kann damit eindeutig behauptet werden, daß es drei verschiedene Calmodulin-Pools in der Skelettmuskelzelle gibt und daß die am 11. Tag nach Erstmarkierung erhaltenen Unterschiede ca 20% für das Paar freies CaM/integrales Delta der Phosphorylase Kinase und ca 30% für das Paar freies CaM/myofibrilläres CaM betragen.

4. Diskussion

4.1 Eigenschaften der radioiodierten Calmodulin-Derivate

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung der Calmodulin-Gesamtmenge sowie der einzelnen Poolgrößen radioiodierte Calmoduline eingesetzt. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden der Iodierung herangezogen, nämlich das Bolton-Hunter-Verfahren (BOLTON & HUNTER, 1973) und die Iodierungsprozedur nach HUNTER & GREENWOOD (1962) mit Chloramin T und Na^{125}I . Wie bereits in Kapitel 3.1.2.2 ausführlich begründet, wurden die in vitro-Experimente mit dem CT-CaM nach dem letzten Verfahren durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, daß beide Verfahren zur in vitro-Iodierung von verschiedenen Proteinen häufig (BOLTON, 1979) angewandt werden, erscheint die Diskussion der beobachteten Eigenschaften der markierten Calmoduline angezeigt.

Damit das Protein mit der Chloramin T-Methode markiert werden kann, muß es Tyrosyl-Reste enthalten. Dabei spaltet sich aus dem Chloramin T im schwach alkalischen Bereich (pH 7,5) Hypochlorsaure ab, wobei diese die ^{125}I -Anionen zu $^{125}\text{I}^+$ -Kationen oxidiert. Die gebildeten Iodkationen greifen dann in einer elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion den aromatischen Ring des Tyrosins an und reagieren zunächst zum Moniodtyrosin und bei höherer Konzentration an $^{125}\text{I}^+$ zum Dijodtyrosin weiter (BOLTON, 1979).

In manchen Proteinen reagieren auch in kleinerem Umfang Histidin (LI, 1944; COVELLI et al., 1966), Tryptophan (KOSHLAND et al., 1963) und Sulfhydryl-Gruppen (JOVANOVIC et al., 1972). Dabei werden die Methylthio-Gruppen der Methionine durch das Natriumsalz des N-Mono-chlororderivates von p-Toluolsulfonamid (Chloramin T) besonders in Mitleidenschaft gezogen (SHECHTER et al., 1975; WALSH & STEVENS, 1977), weil sich Methioninsulfoxide bilden. Im Falle des Calmodulins, welches mit Na^{125}I und Chloramin T iodiert wird, wurde vermutet, daß die Methionin-Reste 71, 72 und 76 (siehe Sequenz von CaM aus Kaninchen-

skelettmuskel (NAIRN, et al., 1984, in Abb.26 A) unter Iodierungsbedingungen sulfoxidiert werden (THIRY et al., 1980). Die Vermutung stützt sich auf Untersuchungen von WALSH & STEVENS (1979), die eine Sulfoxidation dieser Methioninreste durch Oxidation von Calmodulin mit N-Chlorsuccinimid fanden. THIRY und Mitarbeiter (1980) geben an, daß der Sequenzabschnitt Met-71 bis Lys-77 für die Bindung an die cyclische Nucleotid Phosphodiesterase und deren Aktivierung essentiell ist. Sie schließen dies aus spezifischen, chemisch induzierten Modifikationen in diesem Sequenzabschnitt, u. a. durch Sulfoxidation der Methionylreste in den vermutlichen Positionen 71, 72 und 76 mittels Chloramin T, wobei dieses Calmodulin nicht mehr in der Lage ist, die cyclische Nucleotid Phosphodiesterase Calcium-abhängig zu aktivieren. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Befund der vorliegenden Arbeit, daß ein nach dem Chloramin T-Verfahren iodiertes Calmodulin unfähig ist, die Phosphorylase Kinase Calcium-abhängig zu stimulieren. Wird dagegen der Lys-77 Rest mit Bolton-Hunter-Reagenz modifiziert und dies ist bevorzugt der Fall (GARIEPY et al., 1986), so wird die biologische Aktivität des in dieser Weise veränderten Calmodulins nur unwesentlich gegenüber Adenylatcyclase und cyclischer Nucleotid Phosphodiesterase herabgesetzt (CHAFOULEAS et al., 1979; GARIEPY et al., 1986). Auch diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit der Feststellung in der vorliegenden Arbeit, daß Bolton-Hunter-modifiziertes Calmodulin mit demselben Aktivierungsgrad (5-6fach) die Phosphorylase Kinase in Gegenwart von Calcium aktiviert wie das chemisch unveränderte Kontroll-Calmodulin. Allerdings ist die Affinität des BH-CaM zum Enzym etwa um den Faktor 10 erniedrigt, wobei die K_M -Werte in der Literatur für die Aktivierung der Phosphorylase Kinase mit Calmodulin (Δ) von 10 - 50 nM schwanken (COHEN, 1980; BöHM & JENNISSEN, 1985).

Nach Untersuchungen von GOPALAKRISHNA und Mitarbeitern (1985) kann eine vollständige Freilegung der hydrophoben Areale des Calmodulins nur dann erfolgen, wenn alle vier Calcium-Bindungsstellen mit Ca^{2+} gesättigt sind. Dieser Zustand scheint jedoch nicht die in vivo-Situation wiederzuspiegeln, da Untersuchungen der Arbeitsgruppe HEILMEYER,

A)

CALMODULIN - SEQUENZ

^{Ac} Ala-asp-gln-leu-thr-glu-glu-gln-ile-ala ¹⁰
¹⁵ glu-phe-lys-glu-ala-phe-ser-leu-phe-asp ²⁰
²⁵ lys-asp-gly-asp-gly-thr-ile-thr-thr-lys ³⁰
³⁵ glu-leu-gly-thr-val-met-arg-ser-leu-gly ⁴⁰
⁴⁵ gln-asn-pro-thr-glu-ala-glu-leu-gln-asp ⁵⁰
⁵⁵ met-ile-asn-glu-val-asp-ala-asp-gly-asn ⁶⁰
⁶⁵ gly-thr-ile-asp-phe-pro-glu-phe-leu-thr ⁷⁰
⁷⁵ met-met-ala-arg-lys-met-lys-asp-thr-asp ⁸⁰
⁸⁵ ser-glu-glu-glu-ile-arg-glu-ala-phe-arg ⁹⁰
⁹⁵ val-phe-asp-lys-asp-gly-asn-gly-tyr-ile ¹⁰⁰
¹⁰⁵ ser-ala-ala-glu-leu-arg-his-val-met-thr ¹¹⁰
¹¹⁵ asn-leu-gly-glu-thr-leu-thr-asp-glu-glu ¹²⁰
¹²⁵ val-asp-glu-met-ile-arg-glu-ala-asn-ile ¹³⁰
¹³⁵ asp-gly-asp-gly-glu-val-asn-tyr-glu-glu ¹⁴⁰
¹⁴⁵ phe-val-gln-met-met-thr-ala-lys-COOH ¹⁴⁸

MW: 16700 Da

Calcium - Bindungsstellen:

SITE I : 20 - 31
 SITE II : 56 - 71
 SITE III: 93 - 104
 SITE IV : 129 - 140

B)

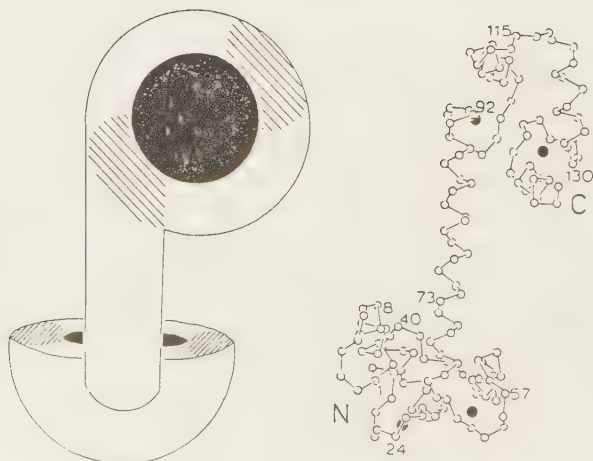


Abb. 26

Abb.26: Sequenz und Raumstruktur von Calmodulin

A) Aminosäuresequenz von Calmodulin aus Kaninchenskelettmuskel (NAIRN et al., 1984)

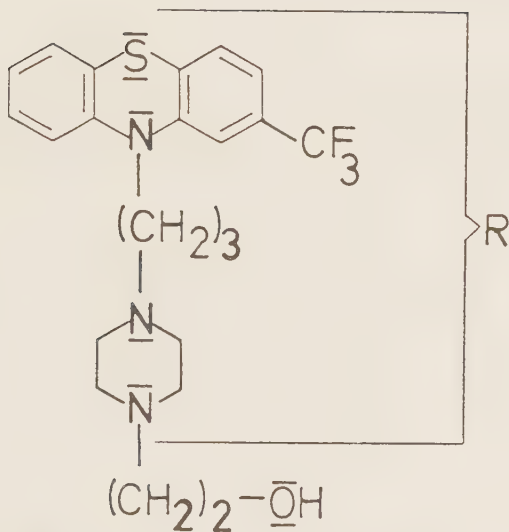
B) Linke Darstellung: Strukturmodell von Calmodulin (KRETSINGER et al., 1986) aus den Röntgenstrukturdaten ermittelt. Die schwarzen Flächen geben die hydrophoben Stellen an.
Rechte Darstellung: Alpha-Kohlenstoffgerüst von Calmodulin (KRETSINGER et al., 1986) in derselben Orientierung wie nebenstehendes Modell. Die schwarzen Kreise symbolisieren die vier gebundenen Calcium-Ionen, C gibt das Carboxi-terminale, N das N-terminale Ende der Polypeptidkette an.

Die Maße des Calmodulins betragen: Länge: 6,5 nm; Durchmesser: 3,0 nm (BABU et al., 1985; KRETSINGER et al., 1986).

die durch Fluoreszenz-Bindungsmessungen zeigte, daß in vivo, also in Gegenwart von ca 10 mM Mg^{2+} aller Wahrscheinlichkeit nach zwei der insgesamt vier Metallionenbindungsplätze mit Magnesiumionen besetzt sind (KOHSE & HEILMEYER, 1981). Weiterhin fanden GOPALAKRISHNA et al. (1985) heraus, daß bei Calmodulin, welches mit Chloramin T modifiziert wurde, nur zwei der insgesamt vier Calcium-Bindungsplätze mit Calcium-Ionen besetzt sind. Dabei weisen die Bindungsplätze im modifizierten Calmodulin eine noch niedrigere Affinität auf, als die niedrig affinen. Ferner fanden GOPALAKRISHNA et al. Hinweise auf geschwächte hydrophobe Wechselwirkungen des mit Chloramin T behandelten Calmodulins zu Phenylsepharose. Doch steht dieser Befund nicht in Einklang mit der Feststellung der vorliegenden Arbeit, daß bei Chromatographie eines Testgemisches CaM/CT-CaM der Durchlauf eine niedrigere spezifische Radioaktivität zeigt als das Eluat (siehe Tab.1). Eine solche Störung der Calcium-abhängigen hydrophoben Wechselwirkungen (GOPALAKRISHNA et al., 1985) von CT-CaM mit Fluphenazin-Sepharose tritt nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kaum auf. Der Mechanismus der Adsorp-

tion von Calmodulin an Phenothiazin-derivatisierte Sepharose, in Gegenwart von Ca^{2+} , wird von ROCHETTE-EGLY et al. (1982) auf Pi-Pi -Wechselwirkungen von Phenylalanin-Resten des Calmodulins mit den Pi -Elektronen des konjugierten Phenothiazin-Systems zurückgeführt. Zusammen mit den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit ergäbe sich damit eine starke Evidenz dafür, daß sich FP-Sepharose-Bindungsstelle und Phosphorylase Kinase-Bindungsstelle unterscheiden sollten, da die FP-Adsorption mit CT-CaM nach wie vor funktioniert und sich dieses Derivat an dem FP-Gel wie das chemisch unveränderte Calmodulin verhält und der Sequenzbereich Met-71 bis Asp-80 kein Phenylalanin enthält. Dies muß jedoch nicht so sein, da jüngste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (BOTZET & JENNISSEN, 1988, unveröffentlicht) zeigen, daß Phosphorylase Kinase an immobilisiertes CT-CaM praktisch genauso Calcium-abhängig adsorbiert wird, wie an immobilisiertes nicht modifiziertes Calmodulin. Jedoch erfährt die obige These verschiedener Bindungsstellen für Kinase und Phenothiazine weitere Unterstützung dadurch, daß seit 1985 die Kristallstruktur des Calmodulins (Auflösung: 0,30nm) bekannt ist (BABU et al., 1985) und es unwahrscheinlich erscheint, daß dieses hantelförmige Protein mit Phosphorylase Kinase und Fluphenazin an derselben Region wechselwirken soll. Die Röntgenstruktur des Calmodulins wurde später von KRETSINGER et al. (1986) ergänzt, wenn auch mit geringerer Auflösung von 0,36 nm. KRETSINGER und Mitarbeiter schlagen in ihrer Arbeit aufgrund der ermittelten Röntgenstrukturdaten ein Modell für das Calmodulin vor, bei dem sich in der Nähe der Calcium-Bindungsstellen in Gegenwart von Ca^{2+} zugängliche hydrophobe Zonen befinden (siehe Abb.26 B). Diesem Strukturvorschlag nach zu urteilen, befindet sich die durch Chloramin T veränderte Region im "Stielbereich", sodaß eine Störung der hydrophoben Zonen nicht möglich ist. Noch weitreichendere Evidenz für die These, daß die CT-CaM/FP- und die CaM/FP-Wechselwirkung an diesen beiden eher endständigen Bereichen der Calmodulin-Struktur auftreten, liefern theoretische Überlegungen von STRYNADKA et al. (1988), die durch vergleichendes Molecular Modeling mit Troponin C folgende Calcium-abhängigen Bindungsbe-

A)



B)



Abb.27: Konfiguration zweier verwandter Phenothiazin-Derivate:

A) Fluphenazin (FP)

B) Trifluoperazin (TFP)

Beide Verbindungen werden als Neuroleptikum eingesetzt

reiche für das mit Fluphenazin chemisch sehr eng verwandte Trifluoperazin (siehe Konfigurationsvergleich in Abb.27) vorhersagten:

a) N-terminale Calmodulin-Hälfte: Glu-11 und Glu-14 binden den Piperazinyrest, das Phenothiazin-System soll Wechselwirkungen in Gegenwart von Ca^{2+} eingehen mit: Ala-15, Leu-18, Phe-19, Val-35, Met-71, Met-72.

b) C-terminale Molekülhälfte: Glu-84, Glu-87 als Bindungsplatz für die Piperaziny-Gruppierung und Ala-88, Val-91, Phe-92, Val-108, Met 109, Met-144, Met-145 als Bindungsorte für das Phenothiazin-Gerüst.

Den Befunden der vorliegenden Arbeit nach zu urteilen, scheinen zumindest die Methionine 71, 72 und 76 keine Bedeutung für die Adsorption von CT-CaM an Fluphenazin-Sepharose zu haben. Dafür spricht auch, daß diese Methionin-Positionen sich im "Stielbereich" der Calmodulin-Struktur befinden (KRETSINGER et al., 1986). Allerdings haben diese Sequenz-Positionen einen Einfluß auf die Aktivierung der Phosphorylase Kinase und auf die Ca^{2+} -abhängige elektrophoretische Mobilität. Möglicherweise finden in dieser Region, unter Calcium-Anlagerung, Konformations-Änderungen der Proteinraumstruktur statt, wobei diese Molekülbeweglichkeit für die Aktivierung eines Zielproteins wesentlich ist und der Verlust dieser sich als erster Hinweis im Fehlen der Calcium-abhängigen SDS-Gel-Mobilität äußert, wobei dieser Effekt auf eine erhöhte SDS-Beladung der Proteinoberfläche in Gegenwart von Ca^{2+} zurückzuführen ist.

Damit erhält die in der vorliegenden Arbeit zunächst empirisch gefundene Eignung der Kombination: CT-CaM/FP-Sepharose für die Poolbestimmungsexperimente mittels Isotopenverdünnungstechnik eine theoretische Untermauerung.

4.2 Calmodulin-Gehalt der Skelettmuskelzelle des Kaninchens

Seit der Entdeckung des Calmodulins (CHEUNG, 1970; KAKIUCHI & YAMAZAKI 1970) wurde dieses Protein in unterschiedlichen Mengen in praktisch

allen Geweben (Rev. KLEE et al. 1982; BURGESS et al., 1983) vollkommen verschiedener Organismen von der Hefe (HUBBARD et al., 1982; LONDESBOROUGH & NUUNTINEN, 1987) über Seeigel (BURGESS, 1982) bis zum Säuger (CHEUNG, 1970; SMOAKE et al., 1974) nachgewiesen. Beim Vergleich des Calmodulingehaltes der verschiedenen Vertebratengewebe stellte sich heraus, daß das elektrische Organ des elektrischen Aales (*Electrophorus electricus*) den höchsten Calmodulingehalt, nämlich 1g/kg Gewebe aufwies (CHILDERS & SIEGEL, 1975; CHAFOULEAS et al., 1979). Dabei besteht das gesamte aus Elektropilax isolierte Protein zu 2-5% aus Calmodulin. Der niedrigste Calmodulingehalt bei Vertebraten findet sich dagegen in Muskel- und Herzmuskelgewebe (KLEE et al., 1982). Hier schwanken die bestimmten Werte von 30 mg/kg Skelettmuskel bei der Ratte (YAGI et al., 1978) über 40 mg/kg in Rinderherz bis zu 410 mg/kg im Muskelmagen von Hühnern (KLEE et al., 1982). Beim Kaninchen wurde die Calmodulinmenge erstmals 1979 von SHENOLIKAR et al. abgeschätzt. Sie fanden durch visuelle Schätzung des Proteingehaltes an Hand von SDS-Geleleinen Wert von 50 mg Calmodulin pro Kilogramm Skelettmuskel. In der vorliegenden Arbeit wird mit der erheblich aufwendigeren Technik der Isotopenverdünnung gearbeitet. Zuvor wurde im Gegensatz zu SHENOLIKAR et al. (1979) sorgfältig geprüft, welche Iodierungstechnik und welches Säulenmaterial hierzu geeignet war. Mit dieser erheblich genaueren und mehrmals reproduzierten Calmodulin-Mengenbestimmungsmethode wurden Werte von 100-120 mg/kg Skelettmuskel ermittelt. Dies ist ein mehr als zweifach höherer Wert als der von SHENOLIKAR et al. (1979) bestimmte. Es war bekannt, daß der Holotropooninkomplex, sowie Troponin C alleine, in vitro die Phosphorylase Kinase, Calcium-abhängig stimulieren konnte, daher wurde 1980 aufgrund der Tatsache, daß man zu wenig Calmodulin im Skelettmuskel fand, um die Phosphorylase Kinase in vivo als Delta' zu aktivieren, als Verlegenheitslösung vorgeschlagen, daß das Troponin C, an Stelle von Calmodulin, die Rolle des Modulators der Phosphorylase Kinase einnehmen soll (COHEN, 1980), wobei derselbe Autor einräumt, daß eine 50 bis 100fache Menge des Calmodulins an Troponin ($K_M(\text{Troponin})$: 1,2 μM , $K_M(\text{DELTA'})$: 20-50

nM) erforderlich ist, um die Phosphorylase Kinase zu aktivieren. Allerdings steht diese von COHEN geforderte Troponin-Menge im Muskel zur Verfügung. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmung der Calmodulin-Gesamtpoolgröße kann diese, 1980 von COHEN vorgeschlagene und später wieder aufgegriffene (COHEN, 1983; COHEN 1987) sogenannte "Troponinhypothese" der Aktivierung der Phosphorylase Kinase, in vivo (siehe Einleitung), als widerlegt gelten (KAISER & JENNISSEN, 1988): Es ist mit Sicherheit genügend Calmodulin in der Skelettmuskelzelle vorhanden, um die Phosphorylase Kinase in vivo (als DELTA') zu aktivieren. Für diese "Calmodulinhypothese" der Aktivierung dieser Kinase sprachen schon die Immunfluoreszenzuntersuchungen von VEH et al. (1980), die zeigten, daß dieses Ca^{2+} -abhängige Enzym im Sarkoplasma und nicht in den Myofibrillen lokalisiert ist, und damit nicht in unmittelbarer Nähe des Troponins, wie von mehreren Autoren angenommen wurde (SHENOLIKAR et al., 1979; COHEN 1980; COHEN, 1983).

4.3 Differenzierung verschiedener Calmodulin-Pools in der Skelettmuskelzelle

Bislang wurden zwei Calmodulin-Pools in der Skelettmuskelzelle des Kaninchens vermutet (SHENOLIKAR et al., 1979; GRAND et al., 1981), nämlich das freie, zytoplasmatische Calmodulin, sowie die integrale Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase, wobei die Identität dieser Untereinheit mit Calmodulin 1981 durch Sequenzierung gezeigt wurde (GRAND et al., 1981). Die Annahme zweier unterschiedlicher Calmodulin-Pools stützte sich zum einen auf den Befund, daß die integrale Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase nur unter drastischen Bedingungen (Erhitzen, SDS) vom Holoenzym abzutrennen war und zum anderen auf die Tatsache, daß Inkubationen mit ^{14}C markiertem Calmodulin und Phosphorylase Kinase nur etwa zu 10-15% pro Woche austauschten (in vitro, bei Raumtemperatur, GRAND et al., 1981). In der vorliegenden

Arbeit konnte an Hand der in vitro-Verteilung von Chloramin T-markiertem Calmodulin bestätigt werden, daß es sich beim freien Calmodulin, welches im Calcium-freien Extrakt von der Phosphorylase Kinase separiert werden konnte, und bei der integralen Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase tatsächlich um zwei verschiedene Calmodulin-Pools handelt. Dadurch, daß die isolierte Phosphorylase Kinase praktisch nicht mit dem zugesetzten Tracer-Calmodulin austauschte, wurde ferner gezeigt, daß in dieser Enzympräparation keinerlei zusätzliches Calmodulin (DELTA') mitgereinigt wurde. Das bedeutet, daß somit keine "Kontamination" des Delta-Pools der Kinase mit anderem, in der Zelle noch vorhandenem Calmodulin stattgefunden hat. In der vorliegenden Arbeit wurde von Beginn an ins Auge gefaßt, möglichst genaue Aussagen zur Verteilung des Calmodulins in der gesamten Skelettmuskelzelle zu treffen. Daher wurden alle bei der Präparation des Calmodulins, unter den Bedingungen der Isotopenverdünnungsexperimente (Calcium-freie Extraktion, Zusatz eines CT-CaM mit exakt definierter spezifischer Radioaktivität), anfallenden Präparationszweige mit untersucht. Hierbei stellte sich überraschenderweise heraus, daß nach Extraktion der Myofibrillenfraktion mit Calcium-chelatierenden Agenzien (4 mM EGTA und 4 mM EDTA) der überwiegende Anteil des gesamten Calmodulins in den Myofibrillen zurück blieb. Dieser, in den Myofibrillen verbleibende Anteil konnte nur durch Kochen freigesetzt werden. Dieser Befund bedeutet, daß es sich bei diesem myofibrillären Calmodulin um einen bislang unbekannten integralen Calmodulin-Pool handeln muß, da es nur durch Calcium-freie Extraktion nicht von den Myofibrillen zu trennen war. Dennoch zeigte Calmodulin, welches aus diesem Präparationsast isoliert wurde, genau dieselben Eigenschaften wie das zytosolische, nämlich Calcium-abhängige Änderung der elektrophoretischen Mobilität sowie ca. 5-6fache Aktivierung der Phosphorylase Kinase in vitro in Gegenwart von Calciumionen. Die quantitative Auswertung der Isotopenverdünnungsexperimente, durch Vergleich der spezifischen Radioaktivität des zugesetzten ^{125}I -Calmodulins mit der spezifischen Radioaktivität des in jedem Präpara-

tionszweig erhaltenen Calmodulin-Endproduktes lieferte das Resultat, daß sich die Calmodulin-Gesamtpoolgröße folgendermaßen in der Skelettmuskelzelle des Kaninchens verteilt: Zu ca. 15% auf den freien, zytoplasmatischen Pool, zu ca. 19% auf den integralen Pool der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase und zu ca. 67% auf den neu entdeckten integralen Calmodulin-Pool in den Myofibrillen.

Dabei wurde der Delta-Pool der Phosphorylase Kinase wegen des Nicht-austauschens mit zugesetztem Tracer über die Enzymaktivität der Kinase berechnet (COHEN, 1973; COHEN 1978; SHENDLIKAR et al., 1979; COHEN 1980).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu urteilen, ist demnach die Hauptmenge des gesamten zellulären Calmodulins in den Myofibrillen und nicht im Zytoplasma lokalisiert. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren, die gewöhnlich eine Lokalisation der Hauptmenge an Calmodulin entlang der I-Banden des quergestreiften Skelettmuskels der Ratte fanden (HARPER et al., 1980; HARPER & STEINER, 1983). Die Verfasser erhielten dieses Ergebnis mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen, die mit anti-Calmodulin Seren (FITC-markiert) durchgeführt wurden.

Es erhebt sich nun die Frage, an welche zellulären Strukturen das Calmodulin innerhalb der Myofibrillenfraktion gebunden sein könnte: Es liegen Berichte vor, daß Calmodulin an Membranstrukturen gebunden sein kann, so beispielsweise an die Erythrozyten-Membran (KLINGER et al., 1984), in der es endogen vorliegen soll und nicht durch EGTA eluiert werden kann, sondern erst durch Zerstörung der Membran oder durch Behandlung der Ghost-Membran mit Oleinsäure freigesetzt werden kann. Desweiteren wurde kürzlich gezeigt, daß Bürstensaummembranen der Niere bei Schweinen und intestinale Bürstensaummembranen bei Hühnern ebenfalls ein integrales Calmodulin enthielten (DE SMEDT et al., 1987). Dieses Calmodulin war unempfindlich gegenüber einer Calcium-freien Extraktion mit EGTA. Es konnte erst durch Behandlung mit Triton X-100 isoliert werden. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigt sehr klar, daß es eine Reihe Calcium-unabhängiger Wechselwirkungen zwischen Calmodulin

und Calmodulin-bindenden Proteinen gibt. Sie fanden beispielsweise in einer Fraktion der Mikrovilli beim Intestinum des Huhnes eine ATP-abhängige Freisetzung von Myosin und Calmodulin, wobei diese Villi zuvor Calcium-frei extrahiert wurden. Ferner demonstrierten sie eine Bindung von Calmodulin und des 110 KDa-Proteins (Cross-Bridge Protein) an zytosolisches F-Actin in Abwesenheit von ATP, jedoch nicht in Anwesenheit von ATP. Insgesamt ergaben sich in diesem Bürstensaummembransystem komplexe Verhältnisse für die Verteilung des Calmodulins in den Membran- bzw. Zytoskelettfractionen, sowohl beim Schwein, als auch beim Huhn und sowohl in den Bürstensaummembranstrukturen von Niere, als auch in Därmen.

Weiterhin wurde ebenfalls kürzlich von einer brasilianischen Arbeitsgruppe über ein an Actomyosin gebundenes endogenes Calmodulin in Kaninchenhirnen berichtet, wobei dieses ebenfalls nur mit Triton X-100 loszulösen war (FERRO, 1987).

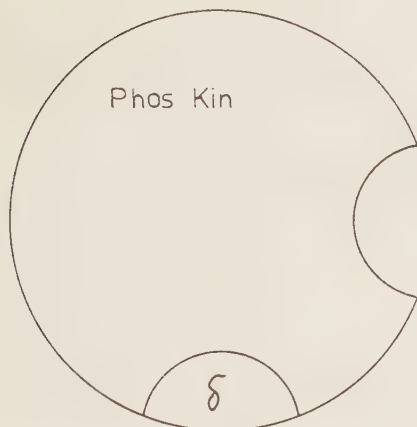
Dieser kurze Überblick zeigt, daß eine Vielzahl von Möglichkeiten existiert, wie Calmodulin Calcium-unabhängig entweder an Membranen direkt, oder an Calmodulin-bindene Proteine, wie z.B. zytosolisches Actin fest gebunden sein kann, sodaß eine Extraktion mit EGTA lediglich dasjenige Modulatorprotein ausspült, welches über Calcium-Protein-Wechselwirkungen gebunden wird.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Verteilung des Calmodulins in der Skelettmuskelzelle des Kaninchens kommt man zu einem neuen Modell der Regulation der Phosphorylase Kinase in diesem Zelltyp: Es existieren nämlich gleiche Mengen (je ca 17% des gesamten Calmodulins) an freiem Calmodulin und an Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase. Das bedeutet, daß pro Mol Kinase genau ein Mol freies Calmodulin, in Gegenwart von Calciumionen, zur Verfügung steht. In Anlehnung an die, in der Elektronik "Flip-Flop" genannte, bistabile Kippschaltung und in Analogie zu der Bindung von Caldesmon an Calmodulin, in Gegenwart von Calciumionen und der Bindung von Caldesmon an F-Actin (des Zytoskeletts) in Abwesenheit von Ca^{2+} (KAKIUCHI & SOBUE, 1983), wird dieses Modell im Folgenden "Flip-Flop-Modell"

genannt. In dieser Modellvorstellung bindet sich in Gegenwart von Ca^{2+} der gesamte freie Calmodulin-Pool an die Phosphorylase Kinase und fixiert dadurch dieses Calmodulin, während in Abwesenheit von Calciumionen kein Calmodulin an die Phosphorylase Kinase gebunden wird (siehe Abb.28). Dieses Flip-Flop-Modell stellt mit Sicherheit nur eine grobe Vereinfachung der wirklichen Verhältnisse dar, da vermutlich noch eine Vielzahl unbekannter Calmodulin-bindender Proteine in der Muskelzelle vorkommen. Von den bislang bekannten CaM-bindenden Enzymen spielen die Phosphofructokinase und die Phosphodiesterase nur eine untergeordnete Rolle, da die erstere Calmodulin-Bindungskonstanten von 2 μM (MAYR, 1984a & 1984b) zeigt und die Phosphodiesterase zwar K_M -Werte von ca. 5 nM aufweist, jedoch im Skelettmuskel nur in geringen Mengen vorkommt (THIRY et al., 1980; CHEUNG, 1985). Eine ernstzunehmende Konkurrentin um das Ca^{2+} -CaM wäre die Myosin-Leicht-Kettenkinase mit einem K_M -Wert von 0,3 nM (BLUMENTHAL & STULL, 1982), da diese Kinase jedoch unmittelbar in den Myofibrillen lokalisiert ist und dort hinreichend viel Calmodulin existiert, tritt die Myosin-Leicht-Kettenkinase wohl kaum in Wettbewerb mit der sarkoplasmatischen Phosphorylase Kinase. Ferner ist es beispielsweise denkbar, daß mit Hilfe anderer Calmodulin-bindender Proteine mit unterschiedlichen Affinitäten zu Calmodulin eine feine Regulationsmöglichkeit für viele dieser Enzyme gegeben ist, nämlich dadurch, daß sich bei niedrigen Calciumkonzentrationen ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen, um den freien Calmodulin-Pool konkurrierenden, Calmodulin-bindenden Proteinen einstellt. Hierfür geben KAKIUCHI & SOBUE (1983) ebenfalls Hinweise, da bei Calciumkonzentrationen um 1 μM gleiche Mengen von beiden Caldesmon-Komplexen vorliegen. Das Flip-Flop-Modell der Phosphorylase Kinase-Regulation kann eher als Extremalmodell verstanden werden, weil es bei hoher Calciumionenkonzentration im Muskel, beispielsweise bei Fluchtreaktionen von Beutetieren, eine Situation, in der innerhalb kürzester Zeit Glukosereserven aus dem Glykogenvorrat des Skelettmuskels mobilisiert werden müssen, zusätzlich zum Adrenalin-abhängigen System eine große Bedeutung

FLIP-FLOP - Modell

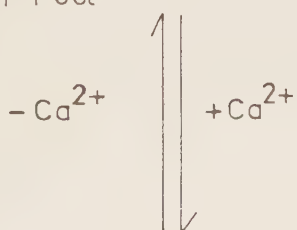
A)



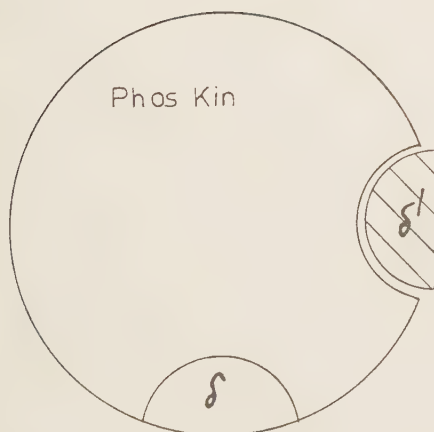
integraler CaM-Pool



freier CaM-Pool



B)



kombinierter integraler und freier CaM-Pool

Abb.28: FLIP-FLOP-Modell der Aktivierung der Phosphorylase Kinase (Phos Kin) durch den freien Calmodulin-Pool, in vivo.

Integraler Delta-Pool (Untereinheit der Phos Kin) und freier CaM-Pool sind gleich groß, jeder Pool stellt etwa 16% des gesamten Skelettmuskel-Calmodulins dar. In Abwesenheit von Calciumionen ist der freie CaM-Pool nicht an die Phosphorylase Kinase gebunden, sondern liegt frei im Zytosol vor (Poolzustand A). In Gegenwart von Calciumionen wird der freie Pool vollständig an die Phos Kin gebunden (Poolzustand B), damit liegt ein kombinierter integraler (Delta) und freier CaM-Pool vor, der eine neue Verteilungssituation des Calmodulins bedingt: Jetzt liegt ca. ein Drittel allen in der Skelettmuskelzelle vorhandenen Calmodulins in, bzw. an die Phosphorylase Kinase als Delta/ gebunden, vor. Dieser eingeschaltete Aktivierungszustand der Kinase kann bei Absenken der zellulären Calciumionenkonzentration wieder in den oberen Zwei-Pool-Zustand (A) umgeschaltet werden. Somit kann, je nach Bedarf der Muskelzelle, wie bei einem FLIP-FLOP zwischen beiden Poolzuständen hin und her geschaltet werden, wobei jeder Einzelzustand solange aufrecht erhalten wird, bis eine Änderung (Umkippen des Zustandes) aufgrund der physiologischen Situation angezeigt ist.

haben kann. So zeigen Untersuchungen von HEILMEYER et al. (1980), daß die Aktivierung der Phosphorylase Kinase im Skelettmuskel (ohne Delta') im Kontraktionsfalle (Calciumkonzentrationserhöhung) nach 8 Sekunden geschieht während die Aktivierung über Calciumionen und nach Epinephrin-Stimulierung derselbe Aktivierungszustand bereits nach 1,5 Sekunden erreicht wird. Da die Calmodulin-Aktivierung der Phosphorylase Kinase denselben Effekt hat wie die Hormonstimulierung in Gegenwart von Ca^{2+} , steht mit dem Flip-Flop-Modell dieser Aktivierungszustand sofort bei Calciumausschüttung zur Verfügung und wäre damit noch schneller als 1,5 Sekunden. Dies würde für Spezies mit solchem Regulationsmechanismus einen großen evolutiven Vorteil darstellen.

4.4 Ergänzende Aussagen zur Differenzierung dreier unterschiedlicher Calmodulin-Pools mit Hilfe der in vivo-Turnover-Messungen

Mit ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob es bei den drei aufgrund der Isotopenverdünnungsexperimente in vitro erhaltenen Calmodulin-Pools zu Unterschieden in ihren Auf- und Abbauraten kommt. Erste Untersuchungen zum Turnover von Calmodulin, genauer von der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase wurden 1979 von PETERSEN & JENNISSEN durchgeführt. In deren Untersuchung wurde nicht nur festgestellt, daß die vier heterologen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase voneinander verschiedene Turnoverraten aufwiesen, sondern es kristallisierte sich heraus, daß das integral gebundene Calmodulin, also die Delta-Untereinheit der oben genannten Kinase, den höchsten Turnover zeigt (PETERSEN & JENNISSEN, 1979). Hierbei lag die für das Recycling von Leucin korrigierte reale Halbwertszeit der Delta-Einheit bei 0,4 Tagen, während die Einheiten Gamma (1,3-2,4 Tage), Beta (1,7-3,3 Tage) und Alpha (1,6-2,9 Tage) (PETERSEN, 1981) deutlich längere Halbwertszeiten aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden, in Anlehnung an die Arbeiten von PETERSEN & JENNISSEN (1979) sowie PETERSEN (1981) zur Ergänzung der in vitro-Ergebnisse zusätzlich Turnoveruntersuchungen der drei erhaltenen Calmodulin-Pools durchgeführt. Hierbei wurde das selbe System: Weiße Neuseeländer Kaninchen, nur männliche Tiere, und Leucin als in vivo-Markierungssagens benutzt. Jedoch wurden von Anfang Pulsdoppelmarkierungsexperimente durchgeführt, da so am ehesten mit einer Differenzierung auch kleiner Unterschiede (ARIAS et al., 1969) der Calmoduline aus den Präparationszweigen Überstand der Säurefällung der Phosphorylase Kinase (freier Pool), Delta-Untereinheit dieser Kinase (1. integraler Pool) und Myofibrillen (2. integraler Pool) gerechnet werden konnte. Dabei wurde zunächst versucht, aus den Abbaukurven, die sich aus der initialen ^3H -Leucin-Applikation über einen Zeitraum von 2 bis 21 Tagen ergaben, die apparente Halbwertszeit zu ermitteln und die drei Calmoduline dadurch zu differenzieren. Für die drei untersuchten Calmoduline erga-

ben sich apparente Halbwertszeiten von 7,7 bis 8,7 Tagen. Da diese apparenten Zeiten recht gut mit den Daten für die DELTA-Untereinheit der Phosphorylase Kinase (PETERSEN, 1981) übereinstimmten, wurden diese Daten mit dem von PETERSEN gefundenen Faktor von 17,5, der das Leucin-Recycling berücksichtigt (siehe Tab.15), zur wirklichkeitsnäheren Halbwertszeit von ca. 10,6 bis 12 Stunden korrigiert. Leider war es aufgrund der überlappenden Standardfehler der errechneten Mittelwerte nicht möglich, eine signifikante Differenzierung der drei vermessenen Calmoduline vorzunehmen. Ferner war es mit dieser Methode nicht einmal möglich, das zum Vergleich mit isolierte Troponin C von den übrigen Calcium-bindenden Polypeptiden zu unterscheiden. Daher erwiesen sich die von vornherein als Pulsdoppelmarkierungsuntersuchungen konzipierten Experimente als unschätzbarer Vorteil.

Nachdem im oberen Abschnitt aus der Abschätzung der verschiedenen Degradationsparameter eine dynamische Gleichheit der drei zur Diskussion stehenden Calmoduline nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden nun die durch einen zweiten ^{14}C -Leucin-Puls (nach 6 bis 21 Tagen, mit konstanter ^{14}C -Inkorporationsdauer von 24 h) erhaltenen $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Turnoverquotienten der untersuchten Proteine ermittelt und miteinander verglichen. Hierbei stellte sich heraus, daß zu jeder untersuchten ^3H -Inkorporationsdauer eine Abweichung dieser Turnover-Quotienten voneinander zu beobachten war. Der ausgeprägteste Effekt zeigte sich am 11. Tag nach Erstmarkierung mit tritiiertem Leucin. Hier lag der Turnover-Quotient der Delta-Untereinheit, also dem 1. integralen CaM-Pool mehr als 20% unter dem $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten des Calmodulins aus dem freien Pool. Dieser Befund konnte durch Wiederholung des Doppelmarkierungsexperimentes am 11. Tag nach Erstmarkierung voll bestätigt werden. Desweiteren zeigte sich ein Quotientenunterschied von ca. 30% für das Paar: Myofibrilläres Calmodulin, bezogen auf das Calmodulin des freien Pools. Auch in dieser untersuchten Relation zeigte das freie Calmodulin die größere Turnoverrate. Da diese unterschiedlichen Turnover-Ergebnisse signifikant gesichert werden konnten ($p < 0,02$), muß man den drei untersuchten Calmodulinen einen

dynamischen Unterschied in ihrem Auf- und Abbauverhalten zugestehen. Dabei wird folgende Reihenfolge für die Geschwindigkeit des Turnovers vorgeschlagen:

freier Pool $>$ Delta-Pool $\geq$ myofibrillärer Pool

Ein Vergleich mit dem gleichzeitig gereinigten, ebenfalls doppelmarkierten Troponin C zeigt, daß hier am 11. Tag ebenfalls der maximale Unterschied vorlag, allerdings mit ca. 64% unter dem Wert des Turnoverquotienten des freien Calmodulin-Pools. Das bedeutet, daß man bei drei mit großer Sicherheit sequenzidentischen Proteinen nur kleinere Unterschiede erwarten darf.

Bei dem myofibrillären Calmodulin-Pool handelt es sich möglicherweise nicht um einen homogenen Pool, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach um mehrere in der Myofibrillenfraktion kompartimentierte Calmodulin-Pools. So liegt zum Beispiel eine kleine experimentelle "Kontamination" mit freiem Calmodulin vor (ca. 1-2% des myofibrillären CaM). Für einen "Mischpool" mit noch unbekannten Kompartimenten sprechen auch die relativ großen Streuungen in den Abweichungen der Turnoverraten, die bei der Reproduktion des Doppelmarkierungsexperimentes am 11. Tag nach Erstmarkierung in Bezug auf den freien Calmodulin-Pool, im Gegensatz zu den Abweichungen des Delta-Pools, erhalten wurden. Das könnte daran liegen, daß die Myofibrillenfraktion zum Beispiel von Präparation zu Präparation einmal mehr oder weniger Sarkoplasmatishes Retikulum oder auch Zellkerne enthält. In beiden Organellen fand man in jüngerer Zeit signifikante Mengen Calmodulin (CHIESI & CARAFOLI, 1983; BACHS & CARAFOLI, 1987).

4.5 Zur Polygenhypothese von Calmodulin

Schon vor längerer Zeit wurde vorgeschlagen, daß das zytoplasmatische Calmodulin und die Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase zwei

verschiedene Pools bilden, wobei beide sich unter getrennter genetischer Kontrolle befinden könnten (SHENOLIKAR et al., 1979). Dem widersprechen jedoch Sequenzbestimmungen von Calmodulin aus dem Skelettmuskel (NAIRN et al., 1984), was nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Calmodulin des freien Pools bedeutet. Die Autoren fanden praktisch dieselbe Sequenz wie für die früher bestimmte der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase (GRAND et al., 1981). NAIRN und Mitarbeiter (1984) schlossen hieraus, falls es wirklich zwei verschiedene Calmodulin-Pools geben sollte, daß sie keinesfalls auf verschiedene Art und Weise genetisch reguliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch sowohl durch in vitro-Experimente als auch durch in vivo-Turnover-Doppelmarkierungen mindestens drei verschiedene Calmodulin-Pools eindeutig differenziert. Ferner stellte sich heraus, daß gerade die von NAIRN et al. (1984) angesprochenen zwei Calmodulin-Pools, nämlich der freie Pool und der Delta-Pool der Phosphorylase Kinase in der Tat Turnoverraten aufwiesen, die sich signifikant (ca. 20%) unterscheiden, und daß weiterhin auch der myofibrillare Calmodulin-Pool wiederum einen signifikanten Unterschied zum freien zeigte (ca. 30%). Wie können verschiedene Turnoverraten einunddesselben sequenzidentischen Proteins erklärt werden? Einerseits existiert die Möglichkeit eines unterschiedlichen Prozessierens des RNA-Transkriptes des entsprechenden DNA-Abschnittes. Hierbei könnte durch verschiedenes Spleißen der RNA einunddesselben Genabschnittes in der Tat verschiedene Syntheseraten von Proteinen identischer Sequenz entstehen, und durch funktionale Kompartimentierung wäre dann auch ein Unterschied in den Degradationsraten denkbar, weil die abbauenden Proteasen verschieden gute Angriffsmöglichkeiten hätten, wobei im Falle membrangebundenen Calmodulins noch zusätzlich der Lipidturnover der Membran eine Rolle spielen könnte. Über solche zweifelsohne denkbaren Möglichkeiten des Prozessierens von RNA liegen im Calmodulin-System bislang wenige Untersuchungen vor, so z. B. bei *Trypanosoma brucei gambiense* (TSCHUDI & ULLU, 1988). Diese Arbeitsgruppe fand bei *T. brucei* zum einen Calmodulin-Gen-Cluster von drei bis vier Genen, die sich tandemartig wieder-

holten (TSCHUDI et al., 1985), sowie ein kompliziertes Prozessierungsmuster der RNA-Präkursoren, wobei Polygentranskripte als authentische Vorstufen der reifen Calmodulin-mRNA auftraten (TSCHUDI & ULLU, 1988). Ferner zeigten die Autoren, daß alle drei Calmodulin-Gene exprimiert wurden. Allerdings sind die molekularbiologischen Erkenntnisse, die an diesem Organismus gewonnen wurden, nur bedingt auf höhere Lebewesen übertragbar, da hier doch eine Reihe von genetischen Besonderheiten auftreten (TSCHUDI & ULLU, 1988). Über die Existenz und die Transkription von zwei oder mehr Calmodulin-Genen, die zu sequenzidentischen Genprodukten bei Ratte und Mensch führen, berichten SENGUPTA et al. (1987). Ähnliche Ergebnisse erhielten CHIEN & DAWID (1984) bei *Xenopus laevis* und SIMMEN et al. (1985) bei Hühnern. Sämtliche Autoren bedienen sich eines molekularbiologischen Instrumentariums. Es wurden keine Turnoverstudien durchgeführt, jedoch legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine solche Möglichkeit mehrerer exprimierter Calmodulin-Gene und damit unterschiedlicher Turnoverraten nahe.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals drei verschiedene Calmodulin-Pools, ein freier Pool, der Delta-Pool der Phosphorylase Kinase und ein bisher unbekannter, myofibrillärer Calmodulin-Pool differenziert werden. Unbeantwortet blieb die Frage, ob der myofibrilläre Pool wirklich homogen ist, und an welche subzellulären Orte das Calmodulin dieses Pools gebunden ist. Hierzu müßte ein weiterer Aufschluß der Myofibrillenfraktion erfolgen und mit dem hier aufgezeigten analytischen Instrumentarium untersucht werden. Ferner könnten hierzu auch Immunfluoreszenzstudien mit anti-Calmodulin-Antikörpern ihren Beitrag leisten. Zur endgültigen Klärung der Frage mehrerer exprimierter Calmodulin-Gene wäre eine Untersuchung von der molekulargenetischen Seite her wünschenswert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Calmodulin, ein saures, hitzestabiles Protein mit einer Molekularmasse von 16,7 KDa gilt als wichtigstes Akzeptorprotein für den 'second messenger' Ca^{2+} in der Eukaryontenzelle. Eine der wichtigsten Funktionen erhält das Calmodulin bei der Aktivierung sogenannter Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinasen wie der Phosphorylase Kinase.

Obwohl die vielfältigen Funktionen des Calmodulins in der Muskelzelle inzwischen recht gut bekannt sind, herrscht noch Unklarheit über dessen genaue Mengen und intrazelluläre Verteilung. Erste Abschätzungen des Calmodulingehaltes ergaben Mengen, die nicht genugten, um die Phosphorylase Kinase ausreichend mit diesem Modulatorprotein zu versorgen. Als Verlegenheitslösung wurde daher die Hypothese vorgeschlagen, daß Troponin das Calmodulin ersetzen könne. Dem widersprachen jedoch Immunfluoreszenzuntersuchungen, die zeigten, daß Phosphorylase Kinase ausschließlich im Sarkoplasma, nicht aber in den Myofibrillen lokalisiert ist. Deshalb wurde mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode durch Zusatz von ^{125}I -Calmodulin zum Homogenisierungspuffer des Muskelaufschlusses die Gesamtpoolgröße und die Verteilung des Calmodulins im Kaninchenskelettmuskel untersucht. Diese Experimente wurden durch in vivo Turnoverbestimmungen mit ^3H - und ^{14}C -Leucin ergänzt.

Die Poolbestimmungen ergaben, daß die Gesamtpoolgröße des Calmodulins im Skelettmuskel des Kaninchens 100-120 mg/kg beträgt. Diese Menge liegt mehr als 2fach über den bisher geschätzten Werten. Die sogenannte "Troponin-Hypothese" der Aktivierung der Phosphorylase Kinase kann damit als widerlegt gelten. Eine weitergehende Analyse ergab, daß es neben dem freien löslichen Calmodulin-Pool zwei weitere, im Muskelhomogenat mit zugesetztem ^{125}I -Calmodulin nicht austauschende (integrale) Calmodulin-Pools gibt:

1. Einen zusätzlichen Phosphorylase Kinase Pool, der bereits vermutet wurde.
2. Einen neu entdeckten Myofibrillen-Pool.

Der gesamte Pool verteilt sich zu ca. 15% auf den freien, zu 19% auf den integralen Pool der Phosphorylase Kinase und zu ca. 67% auf den neuen integralen Myofibrillen-Pool.

Aufgrund der erhaltenen Daten wurde ein anderes Modell der Regulation der Phosphorylase Kinase vorgeschlagen, bei dem in Abwesenheit von Calcium zwei Calmodulin-Pools existieren (der freie und der integrale Pool der Phosphorylase Kinase), aber in Gegenwart von Ca^{2+} nur ein Calmodulin-Pool existiert, bestehend aus dem jetzt an der Kinase fixierten (Delta') vormals freien Pool und dem integralen Calmodulin-Pool der Phosphorylase Kinase (FLIP-FLDP-Modell).

Die Turnoverexperimente unterstützten die oben genannten Ergebnisse, da unterschiedliche Turnoverraten für den freien Pool, einerseits verglichen mit dem integralen Pool der Phosphorylase Kinase (maximaler Unterschied: ca 20%) und, andererseits verglichen mit dem Myofibrillen-Pool (maximaler Unterschied ca. 30%), erhalten werden konnten. Ein Unterschied im Turnover der Calmoduline der beiden integralen Pools konnte noch nicht gesichert werden.

6. LITERATUR

- Appleman, M.M., Rall, T.W. & Dedman, J.R. (1985)
J. cycl. Nucl. and Protein Phosphor. Res. 10, 417-421
- Arias, I.M., Doyle, D. & Schimke, R.T. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 3303-3315
- Autric, F., Ferraz, C., Kilhofer, M.C., Kavadore, J.C.
& Devaille, J.G. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 631, 139-147
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R. &
Cook, W.J. (1985)
Nature 315, 37-40
- Bachs, O. & Carafoli, E. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 10786-10790
- Blumenthal, D.K., Stull, T.C. (1982)
Biochemistry 21, 2386-2391
- Boehm, H. & Jennissen, H.P. (1985)
J. Musc. Cell Res. 6, 93-94
- Bolton, A.E. (1979)
Amersham-Buchler Rev. 18, 12-14
- Bolton, A.E., Hunter, W.M. (1973)
Biochem. J. 133, 529-539
- Bostrum, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B. & Wolff, D.J. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci USA 72, 64-68

Burgess, W.H. (1982)

J. Biol. Chem. 257, 1800-1804

Burgess, W.H., Schleicher, M., van Eldik, L.J. & Watterson, D.M.

(1983)

Calcium and Cell Function 4, 209-261

Buschmeier, B., Meyer, H.E. & Mayr, G.W. (1987)

J. Biol. Chem. 262, 9454-9462

Chafouleas, J.G., Dedman, J.R., Munjaad, R.P. & Means, A.R. (1979)

J. Biol. Chem. 254, 10262-10267

Cheung, W.Y. (1967)

Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 478-482

Cheung, W.Y. (1969)

Biochim. Biophys. Acta 191, 303-315

Cheung, W.Y. (1970)

Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 533-538

Cheung, W.Y. (1980)

Science 207, 19-27

Cheung, W.Y. (1985)

The Harvey Lecture Series 79, 173-216

Chien, Y.H. & Dawid, I.B. (1984)

Mol. Cell. Biol. 4, 507-513

Chiesi, M. & Carafoli, E. (1983)

Biochemistry 22, 985-993

Childers, S.R. & Siegel, F.L. (1975)

Biochim. Biophys. Acta 405, 99-108

Cleland, W.W. (1967)

Adv. Enzym. 29, 1-32

Cohen, P. (1973)

Eur. J. Biochem. 34, 1-14

Cohen, P. (1978)

Curr. Top. Cell. Reg. 14, 117-196

Cohen, P. (1980)

Eur. J. Biochem. 111, 563-574

Cohen, P. (1982)

Nature 296, 613-620

Cohen, P. (1983)

Phil. Trans. R. Soc. London B302, 13-25

Cohen, P. (1985)

Eur. J. Biochem. 151, 439-448

Cohen, P. (1987)

Biochem. Soc. Trans. 15, 999-1001

Cohen, P., Burchell, A., Fouikis, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. &

Nairn, A.C. (1978)

FEBS Lett. 92, 287-293

Collins, J.H., Potter, J.D., Horn, M.J., Wiltshire, G. & Jackman, N.

(1973)

FEBS Lett. 36, 268-272

Dayhoff, M.O. (1976)

Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found. 5,
Washington, USA

- Dedman, J.R. & Kaetzel, M.A. (1983)
Methods Enzym. 102, 1-8
- DeSmet, H., Parys, J.B. & Borghgraef, R. (1987)
Biochim. Biophys. Acta 929, 103-113
- Ebashi, S., Endo, M. & Ohtsuki, I. (1969)
Q. Rev. Biophys. 2, 351-384
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. & Krebs, E.G. (1987)
Ann. Rev. Biochem. 56, 567-613
- Egly, J.M. & Porath, J. (1979)
J. Chromatogr. 168, 35-47
- Fenner, G. (1931)
Naturwissenschaften 19, 310
- Ferro, J.A. & Larson, R.E. (1987)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 145, 1217-1224
- Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1958)
J. Biol. Chem. 231, 65-68
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925)
J. Biol. Chem. 66, 375
- Freifelder, D. (1982)
Physical Biochemistry, Freeman, San Francisco, USA
- Gariépy, J., Mietzner, T.A. & Schoolnik, G.K. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8888-8892
- Gopalakrishna, R. & Anderson, W.B. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 844, 265-269

- Grand, R.S.A., Shenolikar, S. & Cohen, P. (1981)
Eur. J. Biochem. 113, 359-367
- Harper, J.F. & Steiner, A.L. (1983)
Meth. Enzymol. 102, 122-135
- Harper, J.F., Cheung, W.Y., Wallace, R.W., Huang, H.L. & Steiner, A.L.
(1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 366-370
- Haschke, R.H. & Heilmeyer Jr., L.M.G. (1972)
Anal. Biochem. 47, 451-453
- Hayes, F.N. & Gould, R.G.C. (1953)
Science, 117, 480
- Heilbrunn, I.V. & Wiercinski, F.S. (1947)
J. Cell. Comp. Physiol. 29, 15-32
- Heilmeyer Jr., L.M.G., Meyer, F., Haschke, R.H. & Fischer, E.H. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 6649-6656
- Heilmeyer Jr., L.M.G. & Kiliman M. (1982)
Biochemistry 21, 1727-1734
- Heilmeyer Jr., L.M.G., Gröschel-Stewart, U., Jahnke, U., Kiliman, M.
Kohse, P. & Varsanyi, M. (1980)
Adv. Enz. Regl. 18, 121-144
- Herberg, R.J. (1963)
Anal. Chem. 35, 786-787
- Hubbard, L. (1978)
Life Sciences Res. Rep. 11, 363-390

Hubbard, M. Bradley, M. Sullivan, P, Shepherd, M. & Forrester, I.C.
(1982)

FEBS Lett. 137, 85-88

Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962)

Nature, 194, 495-496

IC-Sonderheft (1982)

10, 52-53, München

Jaenicke, L. (1966)

Einführung in die Praxis des Biochemikers, Inst. f. Biochemie,
Universität Köln

Jennissen, H.P. & Heilmeyer Jr., L.M.G. (1974)

Anal. Biochem. 57, 118-126

Jennissen, H.P. & Heilmeyer Jr., L.M.G. (1974)

FEBS Lett. 42, 77-79

Jennissen, H.P. & Heilmeyer Jr., L.M.G. (1975)

Biochemistry 14, 754-759

Jennissen, H.P., Petersen-von Gehr, J. & Botzet, G. (1985)

Eur. J. Biochem. 147, 619-630

Johnson, L.W. & Velick, S.F. (1972)

J. Biol. Chem. 247, 4138-4143

Kaiser, J. & Jennissen, H.P. (1988)

B. Symposium der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,
Fachgruppe: Physiologie und Biochemie, 25./26.3.88, München

Kakiuchi, S. & Sobue, K. (1983)

TIBS 8, 59-62

- Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970a)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 1104-1110
- Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970b)
Proc. Jpn. Acad. 46, 387-392
- Kakiuchi, S. Yamazaki, R. Nakajima, H. (1970)
Proc. Japan Acad. 46, 587-592
- Kamp, A.J. & Blanchard, F.A. (1971)
Anal. Biochem. 44, 369-372
- Klee, C.B. & Vanaman, T.C. (1982)
Adv. in Protein Chemistry 35, 213-321
- Klinger, R., Wetzker, R., Wenz, I., Dinjus, H., Reissmann, R. &
Frunder, H. (1984)
Cell Calcium 5, 167-175
- Krebs, E.G. & Fischer, E.H. (1956)
Biochim. Biophys. Acta 20, 150-157
- Kretsinger, R.H., Rudnik, S.E. & Weissman, L.J. (1986)
J. Inorganic Biochemistry 28, 289-306
- Londesborough, J. & Nuuntinen, M. (1987)
FEBS Lett. 219, 249-253
- Lowry, H.O., Roseborough, N.J., Farr, A.L. & Randell, R.C. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Lämml, U.K. (1970)
Nature, 227, 680-685
- Müller, G.W. & Kick, T. (1983)
BASIC-Programme für die angewandte Statistik, Oldenbourg-Verlag,
München

- Masters, C. (1982)
Curr. Top. Cell. Reg. 21, 205-259
- Mayr, G.W. (1984a)
Eur. J. Biochem. 143, 513-520
- Mayr, G.W. (1984b)
Eur. J. Biochem. 143, 521-529
- Michaelis, L. & Menten, M.C. (1913)
Biochem. Zeitschr. 49, 333-369
- Montgomery, C. (1957)
Arch. Biochem. Biophys. 67, 378-386
- Nairn, A.C., Grand, R.J.A. & Perry, S.V. (1984)
FEBS Lett. 167, 215-220
- Payne, M.E. & Soderling, T.J. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 8054-8056
- Peng, C.T. (1977)
Amersham-Buchler Rev. 17, 33
- Petersen, J. & Jennissen, H.P. (1979)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 340
- Petersen-von Gehr, J. (1981)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Rall, T.W. & Sutherland, E.W. (1958)
J. Biol. Chem. 232, 1065-1070
- Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J. (1957)
J. Biol. Chem. 224, 463-466
- Ringer, S. (1883)
J. Physiol. (London) 4, 29-42

- Rochette-Egly, C., Boschetti, E. Basset, P. & Egly, J.M. (1982)
J. Chromatogr. 241, 333-344
- Rogers, A.W. & Moran, J.F. (1966)
Anal. Biochem. 16, 206
- Sachs, L. (1983)
Angewandte Statistik, Springer-Verlag, Berlin
- Schley, P. (1985)
Kaninchen, Ulmer Verlag, Stuttgart
- Schramm, H.J. & Jennissen, H.P. (1985)
J. Mol. Biol. 181, 503-516
- Sengupta, B., Friedberg, F. & Detera, S.D. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 16663-16670
- Shechter, Y., Burstein, Y. & Patchornik, A. (1975)
Biochemistry 14, 4497-4503
- Shenolikar, S., Cohen, P.T.W., Cohen, P., Nairn, A.C. & Perry, S.V.
(1979)
Eur. J. Biochem. 100, 329-337
- Simmen, R., Tanaka, T., Tsui, K., Putkey, V. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 4704-4712
- Snoake, J.A., Song, S.Y. & Cheung, W.Y. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 341, 402-411
- Stevens, F.C., Walsh, M., Ho, H.C., Teo, T.S. & Wang, J.H. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4495-4500
- Stoclet, J.C., Grand, D., Kilhofer, M.C., Lugnier, C., & Schaefer, P.
(1987)
Prog. Neurobiol. 29, 321-364

- Strynadka, N.C.J. & James, M.N.G. (1988)
Proteins 3, 1-17
- Sundberg, L. & Porath, J. (1974)
J Chromatogr. 90, 87-98
- Sutherland, E.W., Rall, T.W. & Menon, J. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 1126-1131
- Teo, T.S. & Wang, J.H. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 5950-5955
- Teo, T.S., Wang, T.H. & Wang, J.H. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 588-595
- Thiry, P. Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.C., Rathe, J. &
Christophe, J. (1980)
Eur. J. Biochem. 103, 409-414
- Tschudi, C. & Ullu, E. (1988)
EMBO Journal 7, 455-463
- Tschudi, C., Young, A., Richards, F.F. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 82, 3998-4002
- VanEldik, L.J. & Watterson, C. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 4205-4210
- Veh, R.W., Mehnert, F.E., Petersen, J.K.H. & Jennissen, H.P. (1980)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 342-343
- Walsh, M. & Stevens, F.C. (1977)
Biochemistry 16, 2742-2749
- Walsh, M. & Stevens, F.C. (1979)
Biochemistry 17, 3924-3930
- Watterson, D.M., Haselson, W.G. & Vanaman, T.C. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4501-4513

Weast, R.C. (1977)

Handbook of Chemistry and Physics, 57th Edt., CRC Press, Cleveland,
USA

Williams, C.D., O'Riordan, C., Beatti, R.E. & O'Neill, C. (1984)

Biochem. Soc. Trans. 12, 472-474

Yagi, K., Yazawa, M. Kakiuchi, S., Oshima, M. & Uenishi, K. (1978)

J. Biol. Chem. 253, 1338-1340

Zak, R., Martin, A.F. & Blough, R. (1979)

Physiol. Rev. 59, 407-447

Zilversmit, D.B. (1960)

Am. J. Med. 29, 832-848

Zilversmit, D.B., Enteman, C. & Fischler, M.C. (1943)

J. Gen. Physiol. 26, 325-331

7. ANHANG

7.1 Elektronische Chromatographie-Überwachung

Es wurde eine elektronische Schaltung zur automatischen Abschaltung von Säulenchromatographieläufen, in Abhängigkeit von noch vorhandenem Laufpuffer, aufgebaut. Diese Schaltung diente zum Ausschalten der Chromatographiepumpe, sobald der Puffervorratsbehälter leer war. Dadurch wurde ein Trockenlaufen der empfindlichen Chromatographiegele verhindert. Die Schaltung sprach ebenfalls auf störungsbedingtes Auftreten von Luftblasen (über ca. 0,5 ml) im Säulenzulaufsystem, an. Die hier beschriebene Schaltung wurde zu folgenden Zwecken eingesetzt:

Nacht- und Dauerbetrieb vorwiegend großvolumiger Säulen (z. B. Sepharose 4B bei der Isolation der Phosphorylase Kinase), halbautomatischer Auftrag großer Mengen (über 100 ml, z.B. Auftrag des 4B-Pools auf Ionenaustauschgele), zeitsparende Regeneration großvolumiger Säulen und Vorlage eines definierten Puffervolumens und daher kostenreduzierend bei teuren (z.B. Leupeptin-haltigen) Puffern.

Herzstück der Schaltung ist die monolithische, bipolare, integrierte Schaltung (IS) LM 1830 (National Semiconductor GmbH, Fürstenfeldbruck). Diese IS enthält alle wichtigen Baugruppen zum Aufbau eines Flüssigkeitsdetektors für leitende Flüssigkeiten. Die Grundsaltung wurde dem Sonderheft Nr. 10 (1982) der Zeitschrift "IC" entnommen.

Die Schaltung arbeitet mit zwei Platinfuhlerelektroden, über die eine in der IS erzeugte Wechselspannung geschickt wird (Wechselspannung, um Galvanisierungserscheinungen zu vermeiden). Eine Komparatorschaltung vergleicht dann den Widerstand der Flüssigkeit mit einem internen Referenzwiderstand. In Abhängigkeit von diesem Vergleich werden dann die Zustände "Leitung" oder "keine Leitung" entsprechend "Puffer vorhanden" oder "Puffer nicht vorhanden" unterschieden. Das Resultat liegt dann an Pin 12 an. Dieses wird dann über einen Transistor zum Relais weitergegeben. Ist Puffer in der Meßzelle vorhanden, so wird die Basis des BCY 59 angesteuert und das Relais zieht an. Damit ist der elektromechanisch angesteuerte 220V-Verbraucher-Ausgang eingeschaltet. Bei leerem Puffervorrat fällt das Relais ab und unterbricht die Stromzufuhr des

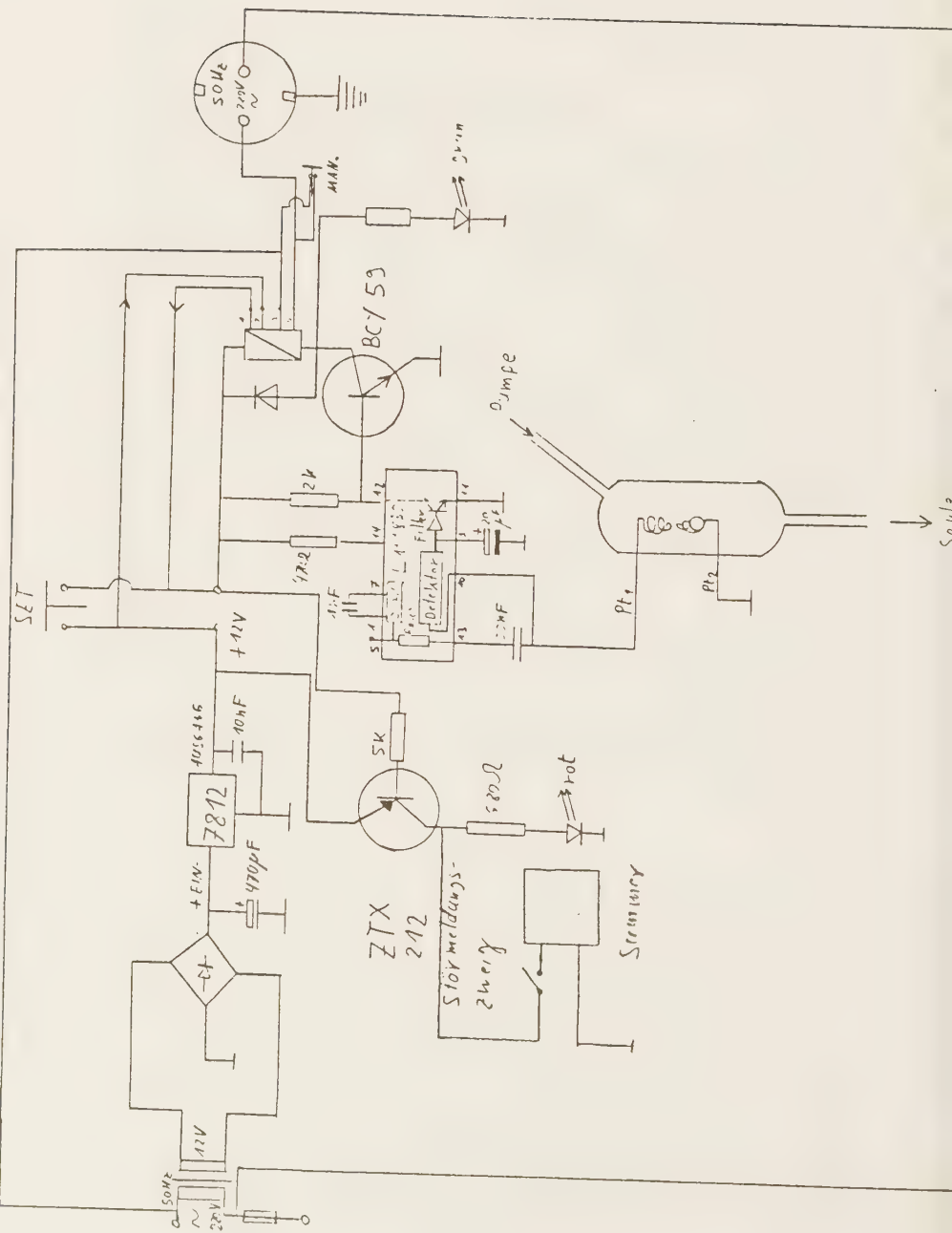
Verbrauchers (Chromatographie-Pumpe) und schützt damit die Säule vor dem Trockenlaufen. Dabei ist die Schaltung so konzipiert, daß durch ein einmaliges Abschalten der Pumpe eine Selbstunterbrechung der Stromzufuhr der Elektronik erfolgt. Damit ist gewährleistet, daß die Pumpe durch Schaumbildung in der Meßzelle (Leitungsmöglichkeit bei Puffern, die SDS und salzhaltig sind) nicht wieder eingeschaltet wird. Um ein Flattern des Relais zu verhindern (zu hohe Abschaltempfindlichkeit) wurde die interne Filterschaltung der IS extern mit einem Elektrolytkondensator beschaltet.

Die verwendete, ebenfalls selbst konstruierte, Meßzelle war zusätzlich als Blasenfänger konzipiert. Aufgrund der Selbstunterbrechung der Schaltung mußte bei Inbetriebnahme Leitung zwischen den Elektroden herrschen und ein manueller SET gegeben werden. Die Schaltung arbeitet seit über 4 Jahren störungsfrei sowohl im Kühlraum als auch bei Raumtemperatur.

Zur weiteren Sicherung des elektronisch überwachten Säulenbetriebs wurde in den Säulenausgang noch zusätzlich ein induktiv arbeitendes Klemmventil (LKB, Gräfelfing) eingeschleift und über einen parallelen Verbraucherausgang an der Schaltung betrieben.

Der Schaltplan der oben beschriebenen elektronischen Schaltung ist in Abbildung 10 gezeigt.

Für die freundschaftliche Beratung bei der Konzeption der Schaltung möchte ich Herrn Gerhard Kampf (Fa. AEG, München) besonders danken.



7.2 Tabelle zu Abbildung 25

³ H-Leu- Exp. Inkorp.-		ABWEICHUNGEN DER QUOTIENTEN UNTEREINANDER		
Nr.	Dauer	Q _{delta} von Q _{frei}	Q _{Myof.} von Q _{frei}	Q _{TNC} von Q _{frei}
	Tage	%	%	%
1*	2	- 7,1 _± 2,1 (/)	- 2,0 _± 0,7 (/)	/
2	6	-13,0 _± 1,4 (<0,02)	- 9,1 _± 0,8 (<0,02)	- 4,4 _± 1,1 (<0,02)
3*	11	-21,1 _± 2,3 (<0,001)	-29,3 _± 4,2 (<<0,001)	-63,5 _± 4,4 (<<0,001)
4	20	- 5,0 _± 0,9 (<0,001)	-18,0 _± 1,0 (<0,02)	-39,8 _± 0,9 (<<0,001)
5	21	-12,8 _± 1,1 (<0,02)	/	/

Tab.18: Prozentuale Unterschiede der ¹⁴C/³H-Turnoverquotienten der untersuchten doppelmakierten Calmoduline und Troponin C.

Die %-Angaben beziehen sich auf die Differenz zum freien Calmodulin, weil dieses den größten ¹⁴C/³H-Turnover-Quotienten aufweist.

Die Werte in Klammern geben die maximalen Irrtumswahrscheinlichkeiten p an. Sie wurden durch einen t-Test für gepaarte Meßwerte ermittelt (siehe 2.6.8.3)

*Bei Versuch 1 wurde nur eine Einfachmarkierung mit ³H-Leucin durchgeführt. Aus den Experimenten 6-21 Tage nach ³H-Leucin-Injektion wurde ein Mittelwert für den konstanten 24 Stundenwert der ¹⁴C-Radioaktivität gebildet und dieser zur Berechnung des Turnover-Quotienten für das Experiment am 2. Tag eingesetzt.

*Die angegebenen Quotienten sind Mittelwerte, die aus zwei Präparationen, die mit 11 Tagen ³H-Inkorporationsdauer durchgeführt wurden.

Lebenslauf

Jürgen Kaiser

geboren am 26.07.55 in Mettlach/Saar

Eltern:

Lutwina Kaiser, geb. Emmel

Werner Kaiser, Montageschlosser

Schulbildung:

Mai 1962 bis	Volksschule Mettlach
Juli 1966	
Sept. 1966 bis	Staatl. Realgymnasium
April 1975	Dillingen/Saar, Abschluß: Reifezeugnis

Grundwehrdienst:

April 1975 bis	Westerland/Sylt und BW-Krankenhaus
April 1976	München

Studium:

April 1976 bis	Chemie, Rheinische Friedrich-
Okt. 1979	Wilhelms-Universität Bonn
09.05.1979	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Okt. 1979 bis	Chemie, Ludwig-Maximilians-
Jan. 1983	Universität München
10.01.1983	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

Jan. 1982 bis	Diplom-Arbeit (bis Jan. 1983),
März 1983	bei Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider
	Max-Planck-Institut für Biochemie
	Abt. f. Virusforschung, Martinsried

Mai 1983 bis	Anfertigung der vorliegenden Disserta-
Juni 1988	tion bei Prof. Dr. H.P. Jennissen
	Inst. für Physiologie, Physiologische
	Chemie und Ernährungsphysiologie der
	tierärztlichen Fakultät, München

